

*Abschlussbericht zum Vorhaben
„Ableitung von gesundheitsbezogenen
Beurteilungswerten für luftgetragene
Biostoffe aus tierexperimentellen
Studien“ (FP-0381)*

Laufzeit

01.07.2015 – 31.12.2016

Bericht vom 30.03.2017

Autoren

Dr. Sandra Walser

Dr. Doris Gerstner

Mihai Zamfir

Dr. Stefanie Heinze

Prof. Dr. Caroline Herr

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung deutsch

Kurzfassung englisch

1. Problemstellung

2. Forschungszweck/-ziel

3. Methodik

4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens

5. Auflistung der für das Vorhaben relevanten Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilten Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen

6. Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels, Schlussfolgerungen

7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan

8. Anhang/Anhänge

Unterschriftenseite verpflichtend für Kooperationsprojekte

Kurzfassung deutsch

Durch arbeitsmedizinische Untersuchungen ist belegt, dass eine berufsbedingte Exposition gegenüber zum Teil hohen Konzentrationen an luftgetragenen Biostoffen zu gesundheitlichen Beeinträchtigungen wie Atemwegserkrankungen, Allergien und Infektionen führen kann. Dennoch gibt es bislang keine gesundheitsbezogenen Beurteilungswerte aus toxikologischen und epidemiologischen Studien. Das Ziel des Projektes war die Ableitung von Dosis-Wirkungsbeziehungen aus tierexperimentellen Studien für luftgetragene Biostoffe, zu denen bisher keine Angaben aus entsprechenden Studien mit menschlichen Probanden vorliegen und für die die Auswertung der Literatur von Humanstudien bisher nicht die erhofften Ergebnisse erbracht hat. Die Zusammenführung der Gesundheits- und Messparameter erfolgte im Rahmen eines systematischen Reviews und unter Einbeziehung eines bundesweiten Expertennetzwerkes. Im Rahmen der Recherche wurden 301 Studien identifiziert, davon gehörten 138 Studien zu der Gruppe der Pilze und 163 Studien zu der Gruppe der Bakterien. Getrennt für beide Gruppen wurden Titel und Abstracts der Publikationen gesichtet und für die Sichtung im Volltext 61 Pilzstudien und 50 bakterielle Studien beschafft. Nach Sichtung der Volltexte wurden 4 Publikationen aus der Gruppe der Pilze eingeschlossen. Bezüglich der Bakterien wurden keine relevanten Studien identifiziert. Insgesamt hat die Analyse der Studien ergeben, dass die Wirkungsseite gut beschrieben wurde, eine Wirkung vorhanden ist und diese wahrscheinlich auch dosisabhängig ist. Bezüglich der Expositionserfassung hingegen sind die Studien als problematisch einzustufen und bedürfen der Verbesserung. Daher konnten auf Basis der aktuellen Studienlage keine gesundheitsbezogenen Beurteilungswerte für Bioaerosole abgeleitet werden. Insgesamt ist festzustellen, dass weitere Studien nötig sind, die eigens für die Ableitung von Dosis-Wirkungsbeziehungen von Bioaerosolen konzipiert werden müssen. Hierfür können aufgrund der gesammelten Erfahrungen Empfehlungen gegeben werden.

Kurzfassung englisch

Occupational studies have shown that exposure to high concentrations of airborne biological agents can lead to health problems such as respiratory diseases, allergies and infections. However, there are currently no health-related threshold levels based on toxicological and epidemiological studies available. The aim of the project was therefore to derive dose-response relationships from animal-experimental studies for airborne biological agents, for which no data from corresponding studies with human subjects have so far been available, and for which the evaluation of literature from human studies has not yielded the expected results until now. The integration of health and measurement parameters was carried out within the framework of a systematic review and with the involvement of a nationwide expert network. Within the framework of the research, 301 studies were identified, including 138 studies on the group of fungi and 163 studies on the group of bacteria. Separately for both groups, titles and abstracts of the publications were screened and 61 fungal studies and 50 bacterial studies were obtained for full-text screening. After reviewing the full texts, 4 publications from the group of fungi were included. No relevant studies were identified for the bacteria. Overall, the analysis of the studies showed that the health effects were well described, present, and probably dose-dependent. Regarding the exposure analysis, studies are to be classified as problematic and should be improved. Therefore no health-related threshold levels for biological agents could be derived on the basis of the analyzed studies. Overall, further studies are necessary, which must be specially designed for the derivation of dose-response relationships of biological agents. For this, recommendations are provided on the experience gained from this work,

1. Problemstellung

Die Bewertung von Expositionen gegenüber luftgetragenen Biostoffen am Arbeitsplatz, im Innenraum und in der Umwelt wird schon seit längerer Zeit als ein relevantes medizinisches, aber auch methodisches Problem angesehen. Dennoch gibt es bislang keine gesundheitsbezogenen Beurteilungswerte aus toxikologischen und epidemiologischen Studien.

Durch arbeitsmedizinische Untersuchungen ist belegt, dass eine berufsbedingte Exposition gegenüber zum Teil hohen Konzentrationen an luftgetragenen Biostoffen (Bakterien, Pilze, Endotoxine) z. B. in der Landwirtschaft und der Abfallwirtschaft zu gesundheitlichen Beeinträchtigungen wie Atemwegserkrankungen, Allergien und Infektionen führen kann (Radon and Nowak 2003; Bünger, Deckert et al. 2011; van Kampen, Deckert et al. 2012). Darüber hinaus wird in der Literatur mehrfach beschrieben, dass die Exposition gegenüber luftgetragenen Biostoffen, insbesondere für Risikogruppen wie immuneingeschränkte Personen, z.B. Personen mit Chemotherapien oder nach Organtransplantation, Allergiker und Atemwegsvorgeschädigte ein zusätzliches Gesundheitsrisiko darstellt (VDI-4250-1 2014). Dabei ist zu berücksichtigen, dass diese Risikogruppen heutzutage circa ein Drittel der Normalbevölkerung darstellen (Hermann-Kunz and Thierfelder 2001).

Der Arbeitgeber ist gemäß Biostoffverordnung (BioStoffV 2013) dazu verpflichtet, für berufliche Tätigkeiten mit potentieller Exposition gegenüber Biostoffen eine Gefährdungsbeurteilung durchzuführen. Biostoffe werden entsprechend ihrem Infektionsrisiko in vier Risikogruppen eingestuft. Die Einstufung von biologischen Arbeitsstoffen in Risikogruppen erfolgt nach der Technischen Regel für Biologische Arbeitsstoffe, TRBA 450. Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA) geben den Stand der sicherheitstechnischen, arbeitsmedizinischen, hygienischen sowie arbeitswissenschaftlichen Anforderungen bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen wieder und konkretisieren die Anforderungen der BiostoffV. Es gibt TRBAen zur Einstufung von Pilzen, Viren sowie von Bakterien (Bacteria) und Archaeobakterien (Archaea) in Risikogruppen (TRBA-466 2012). Arbeitsmedizinisch-epidemiologisch begründete Grenzwerte für luftgetragene Biostoffe am Arbeitsplatz liegen weder auf nationaler noch auf europäischer Ebene vor. Die Messung der Hintergrundkonzentration in der Außenluft dient derzeit als Referenz zur Beurteilung der Arbeitsplatzkonzentration von Biostoffen. Für die Beurteilung von biologischen Arbeitsstoffen lassen sich Gesamtkoloniezahlen bzw. Gesamtzellzahlen, spezifische anzüchtbare/auszählbare Mikroorganismen (Leitkeime), spezifische infektiöse Mikroorganismen sowie Bestandteile von Mikroorganismen heranziehen (Grenzwerteliste 2013). Insbesondere an Arbeitsplätzen, an denen gemäß BioStoffV sogenannte nicht gezielte Tätigkeiten mit Biostoffen durchgeführt werden, kann eine Vielzahl von luftgetragenen biologischen Arbeitsstoffen mit potentiell allergisierender oder toxischer Wirkung vorkommen, z. B. in der Abfallwirtschaft, Gebäudesanierung oder Landwirtschaft.

Gegenwärtige medizinische Bewertungen von luftgetragenen Biostoffen orientieren sich an der VDI-Richtlinie 4250 Blatt 1, 2012 der Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL). Weiterhin hat die Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft für Immissionsschutz (LAI) einen Leitfaden zur Ermittlung und Bewertung von Bioaerosol-Immissionen entworfen. Im Bundesland NRW gibt es bereits einen Erlass "Immissionsschutzrechtliche Anforderungen an Tierhaltungsanlagen". Es existieren Methoden für die Emissions- und Immissionsmessung sowie für die entsprechende Ausbreitungsrechnung. Zudem gibt es Orientierungswerte für die Auslösung einer Sonderfallprüfung nach Nr. 4.8 TA Luft und erste Emissionsfaktoren für den Vollzug. Es fehlen jedoch immer noch Kriterien für das im Rahmen der Sonderfallprüfung durchzuführende toxikologische Gutachten sowie Grenzwerte für die Genehmigungspraxis.

In einem vorangestellten systematischen Review zu Humanstudien (Walser, Gerstner et al. 2015) wurde festgestellt, dass die bisher veröffentlichten Studien nicht die erforderlichen Daten für die Ableitung von Dosis-Wirkungsbeziehungen liefern konnten.

Die Hauptgründe dafür waren:

- das Fehlen spezifischer medizinischer Studien;
- die Vielfalt der in Frage stehenden Mikroorganismen (Anlagen);
- die Vielfalt der Wirkungsendpunkte.

Daher ist es notwendig und wie in der Toxikologie üblich, bei der Ableitung von wirkungsbezogenen Werten für die Allgemeinheit (Außenluft oder Innenraumluft) auf Tierversuche zurückzugreifen, um wirkungsbezogene Beurteilungswerte abzuleiten.

2. Forschungszweck/-ziel

Das Ziel des Projektes ist die Ableitung von Dosis-Wirkungsbeziehungen aus tierexperimentellen Studien für luftgetragene Biostoffe, zu denen bisher keine Angaben aus entsprechenden Studien mit menschlichen Probanden vorliegen und für die die Auswertung der Humanliteratur bisher nicht die erhofften Ergebnisse erbracht hat. Grundvoraussetzung für die Eignung der Studien ist das Vorliegen von Messparametern sowohl auf der Expositions- als auch auf der Wirkungsseite.

Die Zusammenführung der Gesundheits- und Messparameter aus bisherigen Untersuchungen erfolgt im Rahmen eines systematischen Reviews nach internationalen Standards (WHO: Evaluation and use of epidemiological evidence for environmental health risk assessment. WHO-working-group. Copenhagen) und unter Einbeziehung von Experten. In diesem bundesweiten Expertennetzwerk werden die nationalen Kompetenzen im Bereich der luftgetragenen Biostoffe zusammengeführt und im Rahmen des Forschungsvorhabens genutzt. Die wirkungsbezogenen Beurteilungswerte sollen nach anerkannten Kriterien und Standards abgeleitet werden, die z. B. in der Toxikologie zur Abschätzung eines gesundheitlichen Risikos Anwendung finden. Diese sind dokumentiert für den Immissionsschutz in VDI 2308, Blatt 1, 2009: „Abschätzung des gesundheitlichen Risikos im Immissionsschutz“ (VDI 2009) oder für Richtwerte für die Innenraumluft der nationalen Ad-hoc-Arbeitsgruppe Innenraumrichtwerte: „Richtwerte für die Innenraumluft: erste Fortschreibung des Basisschemas“, Bundesgesundheitsblatt 55, 279-290, 2012 (Ad-hoc-Arbeitsgruppe-Innenraumrichtwerte 2012). Ein solches Vorgehen ist in der Toxikologie üblich, da für viele Schadstoffe oft nicht ausreichende und geeignete epidemiologische Studien vorliegen und daher für die Ableitung von wirkungsbezogenen Werten für die Allgemeinheit (Außenluft oder Innenraumluft) auf Tierversuche zurückgegriffen werden muss. Hierbei wird die Interspeziesvariabilität mit allometrischen, toxikokinetischen und toxikodynamischen Faktoren berücksichtigt.

3. Methodik

Arbeitsschritte	Zeitraum		Arbeitsziel/Ergebnis
	Von	bis	
Kontaktaufnahmen Projektplanung und - abstimmung	01.07.2015	31.08.2015	Kontaktaufnahme mit den Experten, Abstimmung der Treffen, Entwicklung und Pilottestung der Suchstrategie
Literaturauswahl, -übersicht, - evaluation (s. o. Review)	01.09.2015	30.06.2016	Zusammenstellung der Ergebnisse von Primärstudien hinsichtlich Gesundheitsparametern und Messparametern
Bewertung im Hinblick auf eine Ableitung von wirkungsbezogenen Werten/Wertebereichen nach toxikologischen Kriterien durch die Experten und Vorstellung in einem Netzwerktreffen	01.01.2016	30.09.2016	Umsetzungskriterien für die DGUV*
Projektauswertung und Berichtserstellung durch das LGL AP2	01.09.2016	31.03.2017	Publikationsentwurf sowie Empfehlung für das weitere Vorgehen

*Da eine Ableitung von wirkungsbezogenen Werten auf Basis der analysierten Studien nicht möglich war, konnten keine Umsetzungskriterien erstellt werden. Stattdessen wurden Empfehlungen für künftige Studien gegeben, die eine Ableitung ermöglichen.

4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens

Systematische Literaturrecherche

Die Vorgehensweise erfolgte in Anlehnung an die Suchstrategie des Reviews der Humanstudien (Walser, Gerstner et al. 2015). Die Festlegung der Suchstrategie mit entsprechenden Suchbegriffen erfolgte strukturiert in einzelnen Suchschritten und mündete in folgende 5 Gruppen, die mit „AND“ verknüpft wurden: Tier(modell), Exposition, Mikroorganismen, Expositionseinheiten, Gesundheitseffekte. Um die Suchergebnisse stärker auf die Fragestellung auszurichten, wurden Begriffe in der Suchstrategie über den Booleschen Operator „NOT“ ausgeschlossen. Um die Suche auf Veröffentlichungen in den Sprachen Englisch und Deutsch einzuschränken, wurde ein Suchfilter angewendet. Die Recherche wurde in der Datenbank Medline über das Zugangsportal PubMed durchgeführt. Die Suche erfolgte getrennt für Bakterien und Pilze und unter Anwendung folgender Suchstrategie:

```
(animal model OR mouse OR rabbit OR rat OR rodent OR murine)
```

AND

```
("inhalation"[All Fields] OR aerosolized OR aerosol OR bioaerosols OR bio-aerosol OR "Environmental Exposure"[MeSH Terms])
```

AND

```
((aspergill* OR "fungi"[All Fields] OR "fungi"[MeSH Terms] OR "mold"[All Fields] OR "mould"[All Fields] OR "molds"[All Fields] OR "moldy"[All Fields] OR mouldy OR actinomycetes OR Penicillium OR Stachybotrys OR Alternaria) OR ("bacteria"[All Fields] OR "bacteria"[MeSH Terms]))
```

AND

```
("conidia"[All Fields] OR spore OR hyphae OR dose OR colony forming units OR cfu OR c.f.u.)
```

AND

```
(respiratory OR pulmonary OR pneumonia OR allergic OR sensitization OR histology OR asthmatic OR inflammation OR inflammatory OR cytokine OR immunoassay)
```

NOT

```
("anthrax"[All Fields] OR "bacillus anthracis"[All Fields] OR mycobacterium OR "viruses"[MeSH Terms] OR "viruses"[All Fields] OR "virus"[All Fields] OR "vaccines"[MeSH Terms] OR "vaccines"[All Fields] OR "vaccine"[All Fields] OR bird OR tularensis OR cigarette OR transplant OR "drug therapy" OR "Antimetabolites"[Mesh] OR "Anti-Inflammatory Agents/pharmacology"[Mesh] OR "Antioxidants/pharmacology"[Mesh] OR "Anti-Infective Agents"[Mesh] OR "Drug Therapy, Combination"[Mesh])
```

AND

```
(English[lang] OR German[lang])
```

Die Suchergebnisse wurden in dem Literaturverwaltungsprogramm Endnote gespeichert.

Auswahl der Studien

Eingeschlossen wurden tierexperimentelle Studien mit folgenden Einschlusskriterien:

- Inhalative Aufnahme von luftgetragenen Biostoffen
- Wiederholte Exposition von möglichst 4-6 Std täglich, 5 Tage die Woche, 4 Wochen lang (4h/d, 5d/w; 4w)
- Angaben zu Expositionskonzentrationen in der Luft
- Zielorgan Lunge/Atemwegssystem

Basierend auf festgelegten Ausschlusskriterien (siehe Tabelle 1) wurde die Titel-Abstract-Sichtung vorgenommen. Diese Kriterien fanden weiterhin auch im Rahmen einer Sichtung der Volltexte Anwendung.

Tabelle 1: Ausschlusskriterien

E1	in vitro
E2	Erreger wie z.B. <i>M. tuberculosis</i>
E3	Antigene, Endotoxine, Mykotoxine
E4	intratracheale, intranasale, subkutane Expositionspfade
E5	einmalige Exposition
E6	andere Zielorgane als die Lunge
E7	keine Expositionskonzentrationen
E8	nicht Englisch / Deutsch
E9	Mehrfachpublikationen

Die Titel-Abstrakt-Sichtung erfolgte in Endnote und wurde getrennt für Bakterien und Pilze durchgeführt. Endnote erlaubt die Eingruppierung der Referenzen in Ordnern. Anhand der Ein- und Ausschlusskriterien wurden Ordner gebildet und die bewerteten Referenzen eingeordnet. Auf diese Weise war der Auswahlprozess jederzeit nachvollziehbar. Unklarheiten wurden durch Diskussion und unter Hinzuziehung einer dritten Person gelöst.

Datenextraktion

Aus der identifizierten Literatur wurden die benötigten Informationen extrahiert und mittels eines standardisierten Formblattes in eine Microsoft Access-Datenbank eingetragen. Folgende Daten wurden soweit vorhanden aus allen relevanten Artikeln extrahiert:

- Autor
- Jahr der Veröffentlichung
- Land der Untersuchung
- Studiendesign
- Anzahl und Geschlecht der exponierten Tiere und Kontrollen
- Expositionskonzentrationen pro m³ Luft
- Mikroorganismen und deren Analysemethoden
- Wirkungsendpunkte (Histologie der Lunge, zelluläres Immunsystem)

Ein Großteil der Wirkungsdaten lag in Form von grafischen Darstellungen vor. Deshalb mussten die Mittelwerte und Standardfehler der Zellkonzentrationen mittels Linealwerkzeug in Photoshop Cs6 aus den Screenshots abgelesen werden.

Die 95% Konfidenzintervalle wurden auf Basis der Standardfehler, die in den Studien ausnahmslos grafisch als Balken dargestellt wurden, berechnet. In der Grafik einer Studie (Fogelmark 1989) fehlte die Beschreibung der Fehlerbalken. Bei der Berechnung der Konfidenzintervalle basierend auf diesem Fehlerbalken ergab sich ein negativer Wert für die untere Grenze. Deshalb wurde angenommen, dass in der Grafik der „Balken“ bereits das Konfidenzintervall darstellte. Es wurde versucht, die Autorin dieser Studie aus dem Jahr 1989 zu kontaktieren. Leider war dies nicht mehr möglich. Einzig für eine weitere Studie dieser Autorin aus dem Jahr 1991 konnte über einen Drittautor die Anzahl der exponierten Tiere ermittelt werden.

Jede Studie wurde zunächst von einem Reviewer extrahiert und die Daten in den Extraktionsbogen eingetragen. Die Extraktion wurde dann von einem zweiten Reviewer überprüft und die Qualitätsbewertung und strittige Punkte mit dem Studienleiter konsentiert.

Expertenmeeting

Für die Bewertung durch die Experten wurden die Studien in Form von Steckbriefen zusammengefasst und die Ergebnisse - die Daten zu den untersuchten Gesundheitsparametern (Wirkungsendpunkten) und Konzentrationen luftgetragener Biostoffe - anhand von Grafiken dargestellt.

Die Bewertung und Ableitung von wirkungsbezogenen Werten/Wertebereichen nach toxikologischen Kriterien sollte durch die Experten in einem Netzwerktreffen erfolgen. Die Liste der Experten kann dem Antrag entnommen werden.

Ergebnisse der Literaturrecherche

Abbildung 1 zeigt das Ergebnis der Literatursuche in Medline. Insgesamt ergab die Recherche 301 Treffer, davon gehörten 138 Treffer zu der Gruppe der Pilze und 163 Treffer zu der Gruppe der Bakterien. Getrennt für beide Gruppen wurden Titel und Abstracts der Publikationen gescreent und für die Sichtung im Volltext 61 Pilzstudien und 50 bakterielle Studien beschafft. Nach Sichtung der Volltexte wurden 4 Publikationen aus der Gruppe der Pilze eingeschlossen. Bezüglich der Bakterien wurden keine relevanten Studien identifiziert.

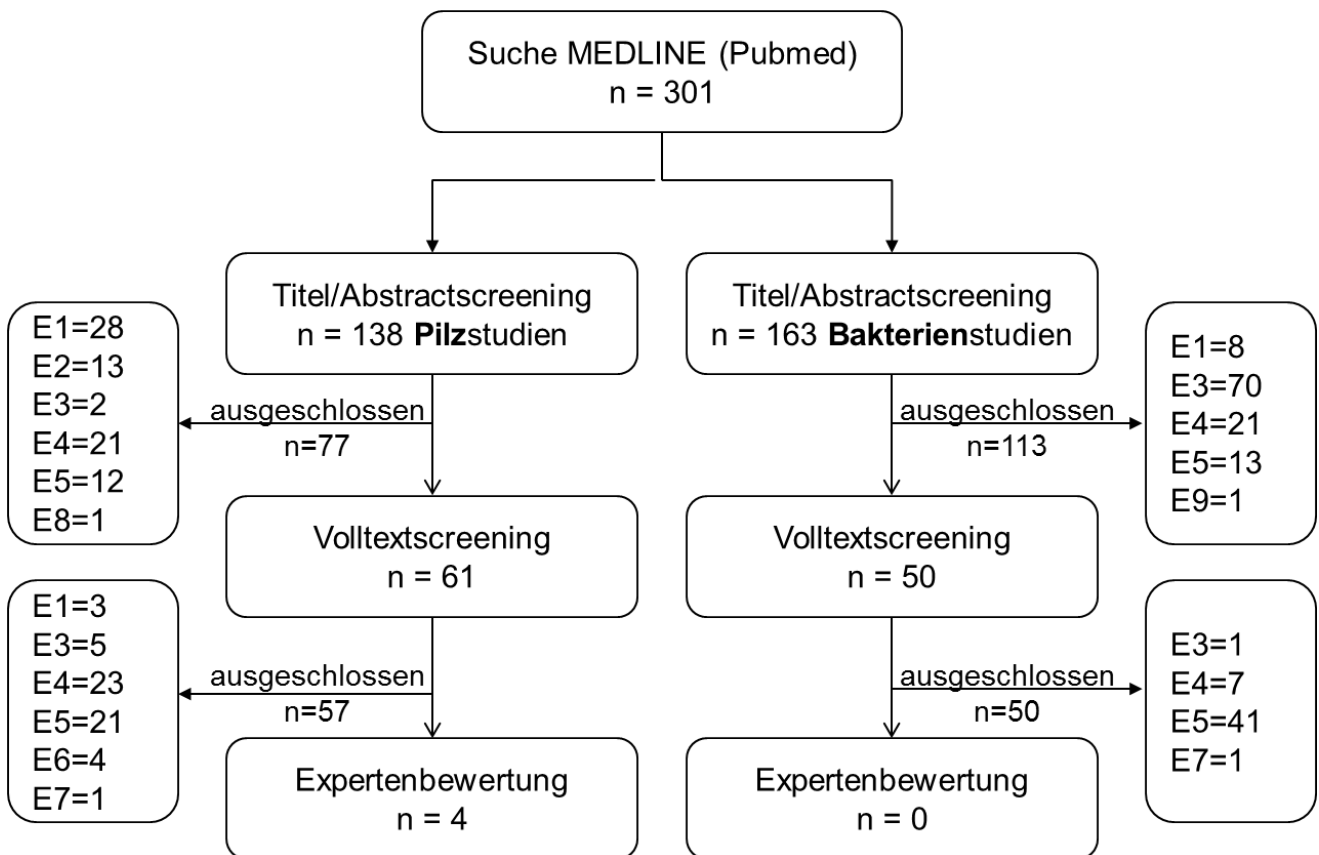


Abbildung 1: Literaturrecherche und Screening

Bei den Pilzstudien wurden insgesamt 32% (44/138) der Studien im Rahmen des Abstract- und Volltextscreening ausgeschlossen, da die Exposition nicht über die Luft erfolgte. Infolge einmaliger Exposition bzw. fehlender Untersuchung von lebenden Tieren wurden weitere 24% (33/138) bzw. 22% (31/138) der Studien ausgeschlossen. Hauptausschlussgrund (44% entsprechend 71/163) bei den bakteriellen Studien war die Untersuchung von Toxinen, bei 33% (54/138) erfolgte eine Einmalexposition und bei 17% (28/138) wurde ein anderer als der inhalative Aufnahmepfad in den Tierexperimenten gewählt.

Studiencharakteristika

Die Charakteristika der 4 eingeschlossenen Studien sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die Studien wurden zwischen 1989 und 2014 veröffentlicht. Drei der Studien stammen von dem gleichen Erstautor, Birgitta Fogelmark, und stimmen deshalb in einigen Studienmerkmalen wie der Erfassung der Wirkungsendpunkte überein. In diesen drei Studien wurden alle Experimente an männlichen und weiblichen Meerschweinchen durchgeführt, wohingegen in der Studie von Buskirk BALB /cJ Mäuse untersucht wurden.

Die Darstellung der Expositionsverhältnisse in den Experimenten erfolgte differenziert für einzelne Parameter mit Ausnahme einer Studie (Fogelmark 1993), in der die Expositionssituation sehr vage - als Exposition gegenüber verschimmeltem Heu - beschrieben wurde. Die Tiere waren in zwei Studien gegenüber *Aspergillus fumigatus* (Buskirk 2014, Fogelmark 1991) exponiert. Die Expositionskonzentrationen der eingeschlossenen Studien lagen zwischen 10^5 und 10^9 Sporen / m^3 . In nur einer Studie (Fogelmark 1991) wurden die Experimente mit zwei verschiedenen Konzentrationen von *Aspergillus fumigatus* vom gleichen Typ und bei gleicher Expositionsdauer durchgeführt.

Der Expositionszeitraum variierte in den Studien zwischen 2 und 12 Wochen, wobei die Dauer der experimentellen Exposition von 2 Stunden pro Tag über 2 Tagen pro Woche (Buskirk 2014) bis 4 Stunden pro Tag über 5 Tage pro Woche reichte (Fogelmark 1993).

In allen Studien wurde die Wirkung auf das Zielorgan Lunge 24 Stunden nach der letzten Exposition untersucht. Zusätzlich wurde von Buskirk et al. die Wirkung nach 2 bzw. 3 Tagen erfasst und von Fogelmark (1993) nach 3 bzw. 7 Tagen.

Übereinstimmend erhoben alle Studien die Zellkonzentrationen (Makrophagen, Lymphozyten, neutrophile und eosinophile Granulozyten) in der Bronchiallavage zu den verschiedenen Zeitpunkten.

Darüber hinaus machten die meisten Studien Angaben zu histologischen Befunden der Lunge, die aber in einer Studie (Buskirk) in Form von einzelnen repräsentativen histologischen Querschnitten dargestellt wurden und deshalb im Rahmen der Extraktion quantitativ nicht beurteilt werden konnten.

Buskirk, Green et al. (2014) berichteten 48 Stunden nach der letzten Exposition mit $1 \cdot 10^5$ *Aspergillus fumigatus* Sporen einen signifikanten Anstieg der Makrophagen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, der B- und T-Zellen in der Lunge. Jedoch ging der Anstieg der Makrophagen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten 72 Stunden später wieder zurück. Bei Fogelmark and Rylander (1993) wurde ein signifikanter Anstieg der Zelltypen in der Bronchiallavage nach einer 5-wöchigen Exposition beobachtet. Darüber hinaus blieben alle Zelltypen mit Ausnahme der eosinophilen Granulozyten auch nach 12-wöchiger Exposition mit $1 \cdot 10^9$ Sporen/ m^3 von verschimmeltem Heu erhöht. Eine Studie der gleichen Autorengruppe aus dem Jahre 1991 (Fogelmark, Lacey et al. (1991) zeigte signifikant erhöhte Zellzahlen an Makrophagen und neutrophilen Granulozyten nach 3 bzw. 5 Wochen dauernder Exposition mit $3 \cdot 10^7$ Sporen/ m^3 *Aspergillus fumigatus*, jedoch zeigte sich dieser Effekt nicht bei einer Konzentration von $7 \cdot 10^5$ Sporen/ m^3 . Lymphozyten und eosinophile Granulozyten hingegen waren bei beiden Expositionskonzentrationen erhöht. Daneben führte auch die Exposition mit *Phanerochaete cryosporium*, *Rhizopus stolonifera*, *Penicillium sp.* und *Faenia rectivirgula* zu einer signifikanten Erhöhung der Makrophagen, Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten. Ähnliche Effekte waren auch in der ältesten Studie dieser Forschergruppe (Fogelmark, Rylander et al. (1989) zu sehen: nach einer Exposition gegenüber verschimmeltem Heu in einer Konzentration von 10^8 - 10^9 Sporen/ m^3 über 3 bzw. 5 Wochen erhöhten sich signifikant die Makrophagen, Lymphozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten in der Bronchiallavage.

Tabelle 2: Studiencharakteristika

Studie	Mikroorganismus	Kultur-methode	Versuchstiere	Expositions-konzentration	Expositions-dauer	Zeitpunkt Analyse	Ergebnisse der Analyse
Buskirk et al (2014)	<i>Aspergillus fumigatus</i> (Wildtyp)	Trockener brauner Reis	7-10 weibliche BALB/cJ Mäuse und 30 Kontrollen je Zeitpunkt	$1 \cdot 10^5$ Konidien (Ablagerung in der Lunge) *	2Std/Tag, 2Tage/Wo für 4 Wo	4, 24, 48 und 72Std nach der letzten Exposition	Bronchiallavage: erhöhte (z. T. sign) Anzahl von Makrophagen, Eosinophilen, Neutrophilen, B-Zellen, CD8+, CD4+; Histologie: Entzündungsreaktionen Serum: Nachweis von IgE-, IgG-Antikörper
Fogelmark et al (1993)	Verschimmeltes Heu	Nasses Heu bei 35°C für 3-4 Wo gelagert	5 weibliche Meerschweinchen (400-500 Gramm)	10^9 Sporen/m ³ **	4Std/Tag, 5 Tage/Wo für 5 und 12 Wo	24Std bzw. 3 und 7 Tage nach der letzten Exposition	Bronchiallavage bzw. Lungenwände: nach 5 Wo Anstieg der Makrophagen, Lymphozyten, und Neutrophilen; nach 12 Wo geringerer Anstieg; bis 7 Tage nach Expositionsende blieben Makrophagen, Lymphozyten erhöht während die Neutrophilen die Normalwerte erreichten.
Fogelmark et al (1991)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Reis bei 38°C für 3-6 Tage inkubiert	20 Meerschweinchen (300-500 Gramm) pro Gruppe	$7 \cdot 10^5$ $3 \cdot 10^7$ Sporen/m ³ **	4Std/Tag 5Tage/Wo für 3 und 5 Wo	24Std nach der letzten Exposition	Bronchiallavage nach 3 bzw. 5 Wo: sign. Anstieg der Lymphozyten, Eosinophilen sign. Anstieg der Makrophagen, Lymphozyten, Neutrophilen und Eosinophilen
	<i>Phanerochaete cryosporium</i>			$2 \cdot 10^9$ Sporen/m ³ **			Sign. Anstieg der Makrophagen, Lymphozyten, Neutrophilen und Eosinophilen (5 Wo)
	<i>Rhizopus stolonifera</i>			$2 \cdot 10^7$ Sporen/m ³ **			Sign. Anstieg der Makrophagen, Lymphozyten, Neutrophilen (3 und 5 Wo)
	<i>Penicillium auratiogriseum</i>			$1 \cdot 10^9$ Sporen/m ³ **			Sign. Anstieg in Lymphozyten und Eosinophilen (5 Wo)
	<i>Faenia rectivirgula</i>	Reis bei 50°C für 3-6 Tage inkubiert		$3 \cdot 10^8$ Sporen/m ³ **			Sign. Anstieg der Makrophagen, Lymphozyten, Eosinophilen (3 und 5 Wo)

Fortsetzung Tabelle 2: Studiencharakteristika

Studie	Mikroorganismus	Kultur- methode	Versuchstiere	Expositions- konzentration	Expositions- dauer	Zeitpunkt Analyse	Ergebnisse der Analyse
Fogelmark et al (1989)	<i>Rhizopus</i> <i>Absidia</i> <i>Aspergillus sp.</i> <i>Eurotium spp.</i> <i>Scopulariopsis</i> <i>Humicola lanuginosa</i> <i>Thermoascus</i> <i>Penicillium</i> Hefen <i>Thermoactinomyces sp.</i> <i>Streptomyces sp.</i>	Nasses Heu bei 35°C in Plastik- säcken gelagert	20 Meerschwein- chen (300-500 Gramm)	10^8 - 10^9 Sporen/m ³ **	4Std/Tag 5Tage/Wo für 3 und 5 Wo	24Std nach der letzten Exposition	Nach 3 bzw. 5 Wo Anstieg der Makrophagen, Lymphozyten, Eosinophilen und Neutrophilen Histologie: alveoläre Zellinfiltrate und erste Granulome

Std = Stunden; Wo = Wochen; sign. = signifikant

* Echtzeit-Messung mittels Partikelzähler und Abschätzung der Konzentration in der Lunge

** Berechnung der Konzentration über die Auszählung von Filterproben

Die Zellkonzentrationen in der Bronchiallavage wurden für die verschiedenen Expositionskonzentrationen der einzelnen Studien in Grafiken zusammengefasst (Abbildungen 2-5) und den Experten in einem Netzwerktreffen präsentiert.

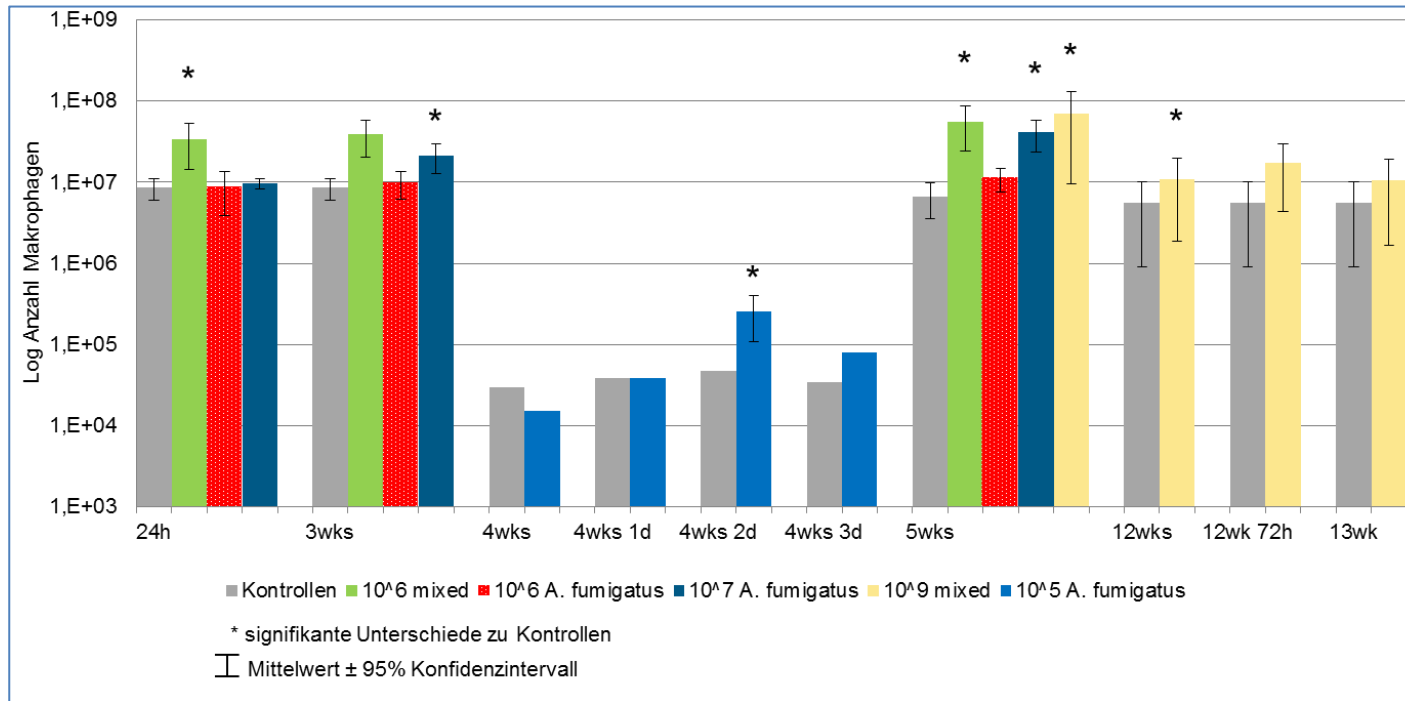


Abbildung 2: Logarithmierte durchschnittliche Anzahl Makrophagen in Bronchiallavage nach Exposition gegenüber Schimmelpilzen

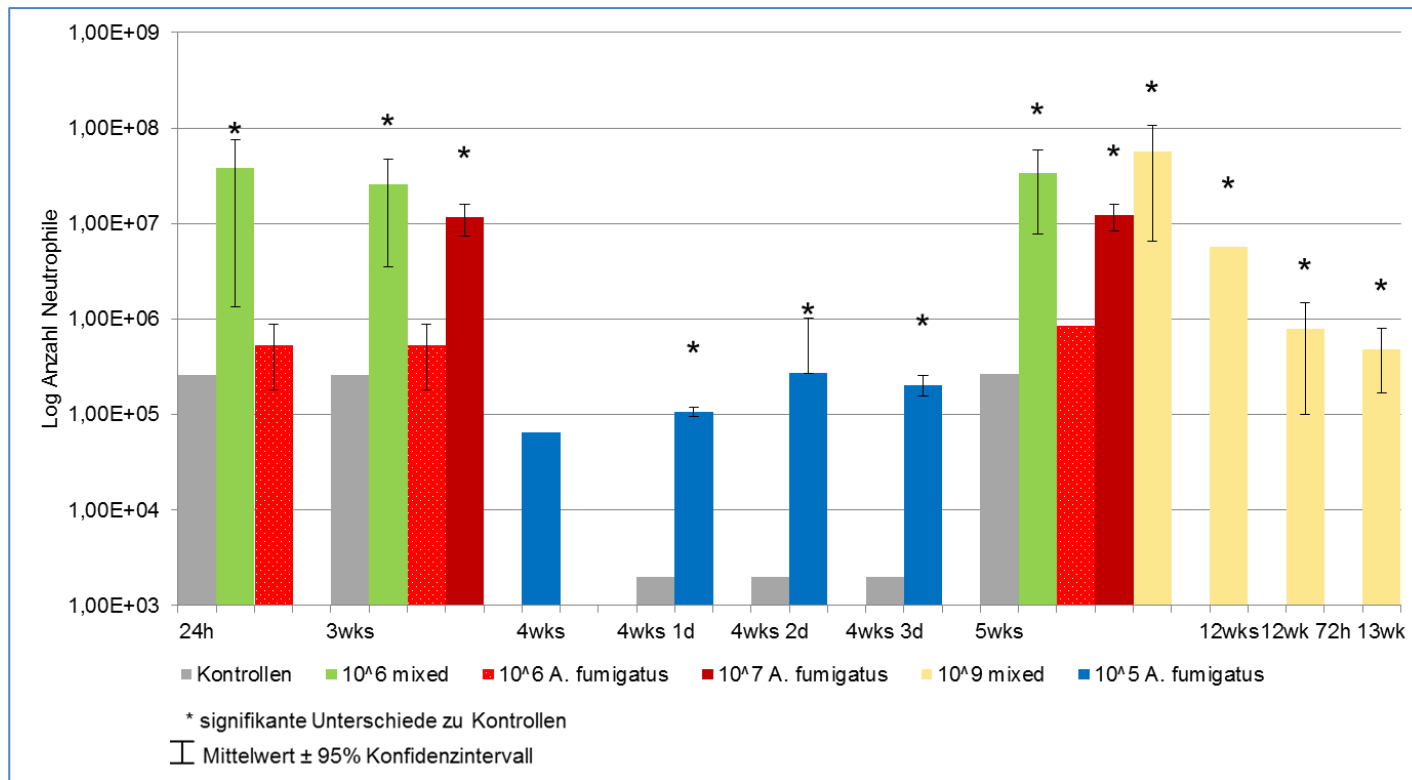


Abbildung 3: Logarithmierte durchschnittliche Anzahl Neutrophile in Bronchiallavage nach Exposition gegenüber Schimmelpilzen

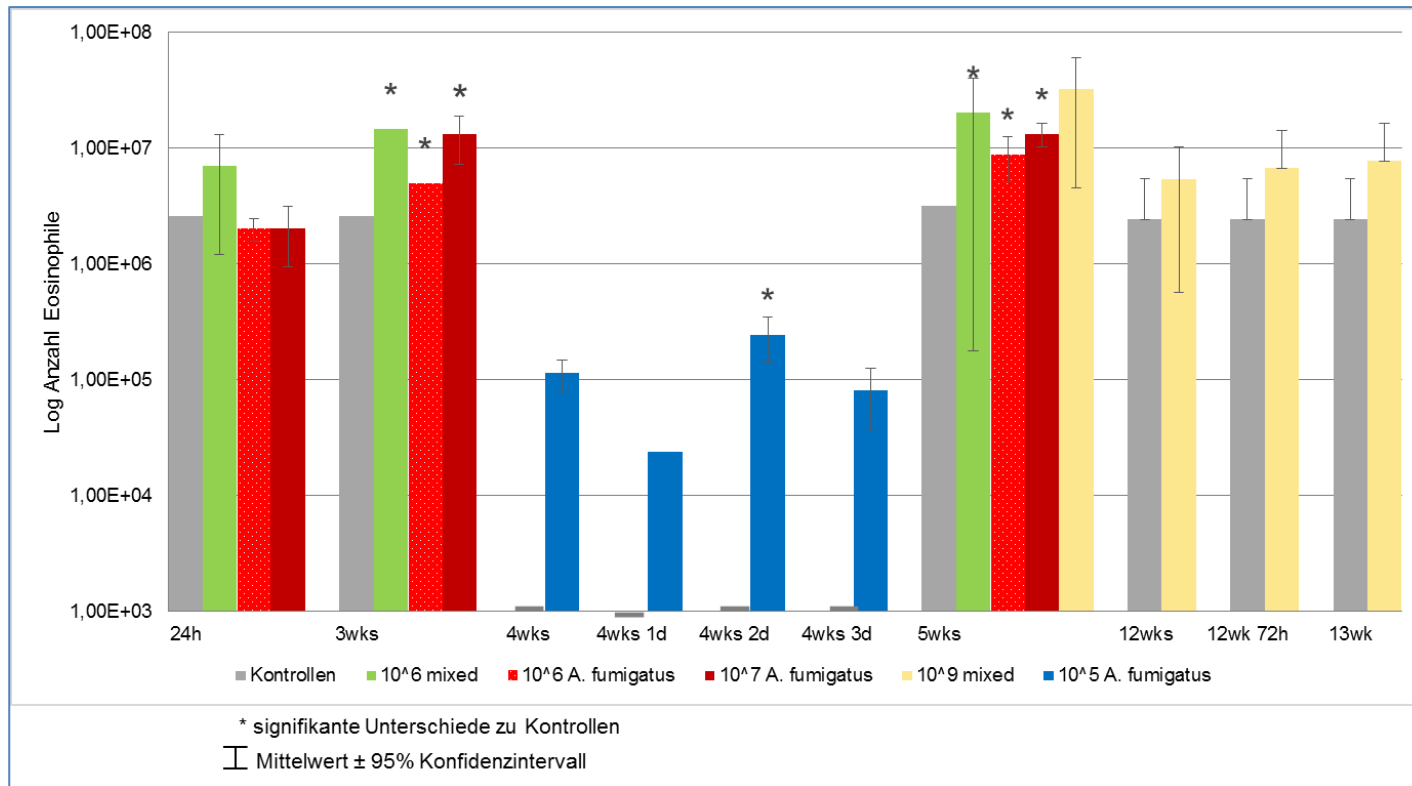


Abbildung 4: Logarithmierte durchschnittliche Anzahl Eosinophile in Bronchiallavage nach Exposition gegenüber Schimmelpilzen

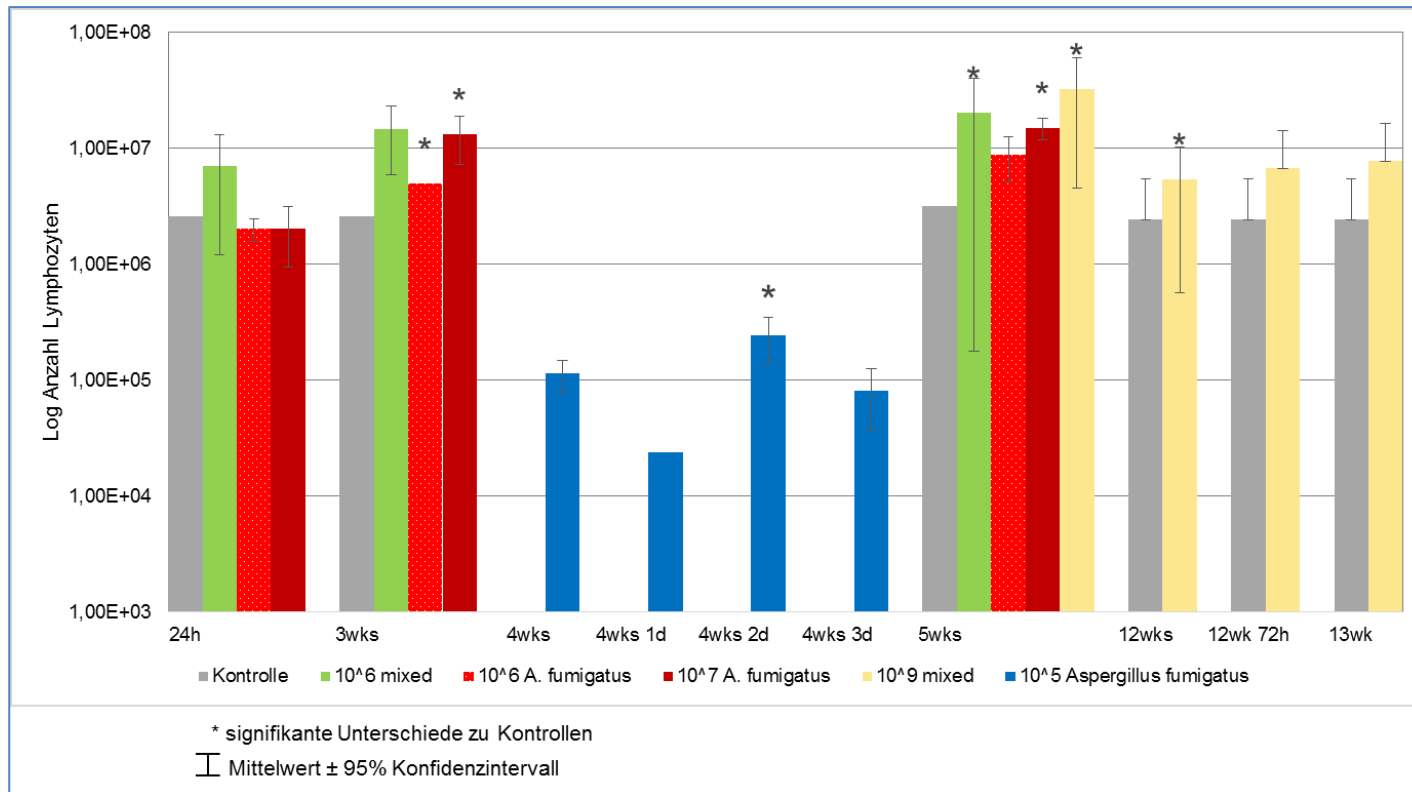


Abbildung 5: Logarithmierte durchschnittliche Anzahl Lymphozyten in Bronchiallavage nach Exposition gegenüber Schimmelpilzen

Expertenmeeting

Die Bewertung der Tierstudien durch die Experten im Einzelnen:

Buskirk 2014:

- Als Pilotstudie gut durchgeführt aber keine Guideline-Studie zur Beurteilung der subakuten Wirkung von *Aspergillus fumigatus*
- Keine Schwellenkonzentration ableitbar, da die Konzentrationsangaben in der Luft fehlen. Möglicherweise kann über die „lung burden“ auf die Konzentration in der Luft zurückgerechnet werden, dann wäre ein erster AEL (Adverse Effect Level) möglich
- Expositionsseite ungenau (kein optimales Dosierungsschema, Vergleichsgruppe mit unbelastetem Reis fehlt), Wirkungsseite gut

Fogelmark 1991:

- Realistische Konzentrationsangaben aber Expositionsbestimmung nur zeitpunktbezogen
- Nachgewiesene Mikroorganismen könnten auch Zufallsbefunde sein, da 4 Stunden Aerosol auf Filtern gesammelt und erst am Ende der Exposition analysiert wurde; mögliche Peaks können nicht detektiert werden
- Es fehlt eine Kontrollgruppe exponiert gegenüber unbelastetem Reis; daher keine echte Vergleichsgruppe

Fogelmark 1993:

- Subchronische Exposition ist annähernd erreicht bei 12 Wochen
- Aerosol undefiniert

Fogelmark 1989:

- Die Konzentrationsangaben von 10^8 - 10^9 erscheinen sehr hoch
- Fehlen einer Vergleichsgruppe mit unbelastetem Reis (s. Fogelmark 1991)
- Zeitpunktbezogene und zufällige Expositionsbestimmung (s. Fogelmark 1991)

Bewertung der Zellkonzentrationen in Bronchiallavage über alle 3 Studien von Fogelmark:

- Effekte können als advers betrachtet werden zusammen mit den histologischen Befunden
- Es kommt zu Erhöhung von Makrophagen etc. bei verschiedenen Expositionskonzentrationen aber eine Schwellenkonzentration für *Aspergillus fumigatus* kann nicht eindeutig bestimmt werden.

Fazit der Bewertung:

Insgesamt wurden bei den analysierten Studien die Wirkungen in Bezug auf die zelluläre Immunantwort laut den Experten gut beschrieben. Jedoch waren auf der Expositionsseite einige Defizite feststellbar. Diese umfassten insbesondere:

- Unzureichende Beschreibung der Methoden für die Aerosol-Erzeugung
- Zeitpunktbezogene Expositionsanalyse; unzureichende Expositionsdauer

- Fehlen von Blindwerten bei der Verwendung von Trägermaterialien für die Pilzsporen (Reis, Heu)
- Keine Kontrollgruppe für jeden Analysezeitpunkt der Wirkungsseite
- Anzahl der exponierten Tiere nicht immer exakt angegeben
- Analysezeitpunkte zwischen den Studien unterschiedlich
- Teilweise nur Expositionsdosis in der Lunge angegeben, jedoch nicht in der Luft
- Unterschiede zwischen den Studien insbesondere auf der Expositionsseite ermöglichen keine Zusammenführung der Daten (Pooling)

Es ist aber anzumerken, dass die Studien nicht primär mit dem Ziel durchgeführt wurden, Dosis-Wirkungsbeziehungen für Bioaerosole abzuleiten. Empfehlungen zur Durchführung entsprechender tierexperimenteller Studien werden in Punkt 7 aufgeführt.

Literatur

- Ad-hoc-Arbeitsgruppe-Innenraumrichtwerte (2012). "Richtwerte für die Innenraumluft: erste Fortschreibung des Basisschemas." Bundesgesundheitsblatt **55**: 279-290.
- BioStoffV (2013). "Verordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen (Biostoffverordnung - BioStoffV)." Bundesministeriums der Justiz in Zusammenarbeit mit der juris GmbH: 1-19.
- Bünger, J., A. Deckert, et al. (2011). Health complaints, lung function, and immunologic effects in German compost workers from long-term exposures to bioaerosols. The Proceedings of the 6th international scientific conference on bioaerosols, fungi, bacteria, mycotoxins in indoor and outdoor environments and human health, New York.
- Buskirk, A. D., B. J. Green, et al. (2014). "A murine inhalation model to characterize pulmonary exposure to dry *Aspergillus fumigatus* conidia." PLoS One **9**(10): e109855.
- Fogelmark, B., J. Lacey, et al. (1991). "Experimental allergic alveolitis after exposure to different microorganisms." Int J Exp Pathol **72**(4): 387-395.
- Fogelmark, B. and R. Rylander (1993). "Lung inflammatory cells after exposure to mouldy hay." Agents Actions **39**(1-2): 25-30.
- Fogelmark, B., R. Rylander, et al. (1989). "Experimental allergic alveolitis after inhalation of mouldy hay." J Clin Lab Immunol **30**(2): 81-85.
- Grenzwerteliste (2013). IFA Report 1/2013. Sicherheit und Gesundheitsschutz am Arbeitsplatz.
- Radon, K. and D. Nowak (2003). "Atemwegs- und Lungenerkrankungen in der Europäischen Landwirtschaft Teil 1: Literaturübersicht." Pneumologie **57**(08): 444-448.
- TRBA-466 (2012). Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin - BAuA (http://www.baua.de/nr_15268/de/Themen-von-A-Z/Biologische-Arbeitsstoffe/TRBA/pdf/TRBA-466.pdf aufgerufen am 09.07.12).
- van Kampen, V., A. Deckert, et al. (2012). Gesundheitsrisiken durch biologische Arbeitsstoffe in Kompostierungsanlagen. Forschung Projekt F 2063. BAUA.
- VDI-4250-1 (2014). Bioaerosole und biologische Agenzien -Umweltmedizinische Bewertung von Bioaerosol-Immissionen -Wirkungen mikrobieller Luftverunreinigungen auf den Menschen. Weißdruck. Düsseldorf, Verein Deutscher Ingenieure: 1-23.
- VDI (2009). "Abschätzung des gesundheitlichen Risikos im Immissionsschutz." VDI 2308 Blatt 1.

Walser, S. M., D. G. Gerstner, et al. (2015). "Evaluation of exposure–response relationships for health effects of microbial bioaerosols – A systematic review." International Journal of Hygiene and Environmental Health.

5. Auflistung der für das Vorhaben relevanten Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilten Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen

Zamfir, M. et al, Assessment of health-related exposure limits for bioaerosols: A systematic review of experimental animal studies, International Journal of Hygiene and Environmental Health (in preparation)

Gerstner, D., Ableitung gesundheitsbasierter Beurteilungswerte für Bioaerosole. 6. LGL Kongress für den Öffentlichen Gesundheitsdienst (ÖGD), 23.-25.09.2015, Regensburg

Walser, S., Ableitung gesundheitsbasierter Beurteilungswerte für Bioaerosole. 34. Internationaler Kongress für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (A+A), 27.-30.10.2015, Düsseldorf

Gerstner, D., Walser, S. Mikrobiell bedingte Luftverunreinigungen – Dosis-Wirkungsbeziehungen – Umweltmedizinische Bewertung. 8. Bayerische Immissionsschutztag, 22. - 23.06.2016, Augsburg

Walser, S., Assessment of health-related exposure limits for bioaerosols – a systematic review of human studies and experimental animal studies, 28th Annual Conference, International Society For Environmental Epidemiology (ISEE), 1-4th September 2016, Rome

6. Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels, Schlussfolgerungen

Im Bereich hochexponierter Arbeitsplätze wie z. B. bei der Abfallverwertung/Kompostierung, Holzverarbeitung und Papierindustrie, Schimmelpilzsanierung sowie in der Landwirtschaft etc. bildet die Festlegung von Schwellenwerten die Basis zur Vermeidung gesundheitsschädlicher Expositionen gegenüber luftgetragenen Biostoffen und trägt damit zur Prävention von berufsbedingten Erkrankungen und Berufskrankheiten wie z.B. dem Organic Dust Toxic Syndrome bei. Die Relevanz von Schwellenwerten zur Prävention arbeitsbedingter Gesundheitsrisiken im Zusammenhang mit der Exposition gegenüber luftgetragenen Biostoffen besteht unvermindert weiter.

7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan

Gesundheitsbezogene Beurteilungswerte würden die Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung bei der Umsetzung des gesetzlichen Präventionsauftrages unterstützen, Berufskrankheiten und arbeitsbedingte Gesundheitsgefahren zu verhüten.

Insgesamt hat die Analyse der Studien ergeben, dass die Wirkungsseite gut beschrieben wurde und eine Wirkung vorhanden ist. Bezüglich der Expositionsseite hingegen waren die betrachteten Studien wenig aussagekräftig und bedürfen der Verbesserung. Daher konnten auf Basis der aktuellen Studienlage keine gesundheitsbezogenen Beurteilungswerte für Bioaerosole abgeleitet werden. Deshalb sind weitere Studien nötig, die eigens für die Ableitung von Dosis-Wirkungsbeziehungen von Bioaerosolen konzipiert werden müssen. Hierfür können aufgrund der gesammelten Erfahrungen folgende Empfehlungen gegeben werden:

- Eine methodisch saubere und standardisierte Herstellung der Aerosole ist bereits möglich und sollte dementsprechend umgesetzt werden.
- Für Bioaerosole sollte als Expositionspfad die inhalative Aufnahme gewählt werden. Eine intranasale oder intratracheale Exposition ist nicht geeignet.
- Es sollte mindestens eine subchronische Expositionsdauer, d.h. 4h/d, 5d/w, 4w, gewählt werden.
- Bei Nutzung von Trägermaterial (z.B. Reis) für die Anzucht von Mikroorganismen zur Aerosolherstellung sollte die Kontrollgruppe gegenüber reinem Trägermaterial exponiert werden.
- Für die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen sollte bzgl. der Versuchstiere folgendes beachtet werden: Informationen zu Anzahl, Geschlecht, Gewicht und Alter der Tiere, die möglichst aus demselben Wurf stammen sollten; ausreichende Zahl an Versuchstieren abhängig von den Versuchsbedingungen.
- In Publikation sind die Expositionsbedingungen exakt darzustellen (z.B. Parameter der Aerosolkammer).
- Für die Ableitung ist nicht nur die Ermittlung eines LOAELs, sondern auch eines NOAELs notwendig.
- Für die Ableitung von wirkungsbezogenen Beurteilungswerten müssen die Kompetenzen auf der Expositionsseite und der Wirkungsseite zusammengeführt werden.

8. Anhang/Anhänge

Publikationsmanuskript

Assessment of health-related exposure limits for bioaerosols A systematic review of experimental animal studies

Mihai Zamfir^a, Doris Gerstner^a, Sandra Walser^a, Jürgen Bünger^b, Thomas Eikmann^c, Stefanie Heinze^{a,e}, Annette Kolk^d, Dennis Nowak^e, Monika Raulf^b, Helmut Sagunski^f, Nadja Sedlmaier^g, Roland Suchenwirth^h, Gerhard A Wiesmuellerⁱ, Klaus-Michael Wollin^h, Irene Tesseraux^j, Caroline Herr^{a,k}

^aBavarian Health and Food Safety Authority, Department of Occupational and Environmental Health, Epidemiology, Munich, Germany

^bInstitute for Prevention and Occupational Medicine of the German Social Accident Insurance, Institute of the Ruhr-University Bochum (IPA), Bochum, Germany

^cInstitute for Hygiene and Environmental Medicine, Justus-Liebig-Universität Giessen, Giessen, Germany

^dInstitute for Occupational Safety and Health of the German Social Accident Insurance (IFA), Unit Biological Agents, Sankt Augustin, Germany

^eInstitute and Outpatient Clinic for Occupational and Environmental Medicine, Ludwig-Maximilians-University Munich, Munich, Germany

^fHamburg Ministry of Health and Consumer Protection, Hamburg, Germany

^gLfU - Bavarian Environment Agency, Division 21, Augsburg, Germany

^hGovernmental Institute of Public Health of Lower Saxony, Hannover, Germany

ⁱHealth Department of the City of Cologne, Department of Infectious and Environmental Hygiene, Cologne, Germany

^jState Institute for the Environment, Measurement and Nature Conservation Baden-Wuerttemberg (LUBW), Karlsruhe, Germany

^kUniversity of Munich, Munich, Germany

Corresponding author:

Mihai Zamfir, M.Sc.

Bavarian Health and Food Safety Authority,
Occupational and Environmental Health, Epidemiology

Pfarrstraße 3

80538 München

Germany

Tel: +49 91 316808-4336

Email: mihai.zamfir@lgl.bayern.de

Abstract

Although exposure to high levels of bioaerosols can be linked to deterioration of the human respiratory system, empirically derived exposure levels are missing for microbiological bioaerosols. A previous systematic review concluded that there was not enough information in the studies on humans to derive an exposure-response relationship. Thus, the aim of this systematic review was to derive exposure limits for bioaerosols related to health effects based on experimental animal studies. A systematic search was done in MEDLINE (PubMed) for chronic *in vivo* exposure of the respiratory system via inhalation of a quantified microbial bioaerosol. A total of $n=301$ studies were retrieved. Abstract screening using predefined inclusion and exclusion criteria was followed by full-text screening and standardized data extraction of study characteristics and measured outcomes. Four suitable studies were identified where mice or guinea pigs were exposed for 4 to 12 weeks to a previously described mixture of fungal spores or conidia via inhalation. The number of macrophages, neutrophils, eosinophils and lymphocytes following chronic exposure has been reported by all included papers and suggested a dose- and time-dependent relationship. Significant inflammation could be detected following chronic exposure to *Aspergillus fumigatus* starting at 3 weeks. However, the outcomes of the studies could not be directly compared due to the large degree of variation and poor description of the exposure such as unspecified number of animals and if the same hay batch was used for all exposures. Additionally, control groups were exposed to clean air only, thus not controlling for the exposure to rice or hay dust. It is our conclusion that given the limitations, more experimental research needs to be done with the specific aim of establishing a no observable effect level (NOEL) and a lowest observed effect level (LOEL) for exposure to bioaerosols present in the environment or near bioaerosol emitting facilities.

Keywords: bioaerosol; inhalation; fungi; animal experiments; *Aspergillus fumigatus*; chronic exposure; exposure limits

Introduction

A biological aerosol, or bioaerosol is a suspension of airborne particles that contains living organisms or constituents that are released from living organisms (Madsen, Larsen et al. 2016). Bioaerosols are a known source of microbial pathogens, endotoxins and other allergens (Madsen, Larsen et al. 2016; Straumfors, Heldal et al. 2016). Fungal spores, bacteria, mycotoxins, pollen and viruses are examples of common bioaerosols.

Although common in nature, certain human activities can lead to increased concentrations in and near certain facilities. Levels of more than 10^4 cfu/m³ microbiological bioaerosols have been measured near dairy processing facilities, agricultural facilities, compost and wood processing facilities (Heldal, Halstensen et al. 2003; Straumfors, Heldal et al. 2016). As they have very small diameters of 2-10 μ m, individual biological aerosols are able to enter deep into the respiratory system, where they are exposed to the host's immune system and produce inflammatory responses (Oremland, Michels et al. 2016).

Whereas, exposure to high concentration biological aerosols would result in a more fulminant disease characterized by granulomas (Olenchock, Green et al. 1983) and lung fibrosis (Blease, Mehrad et al. 2000), studies done in recent years focused on examining low long term exposure that would produce subclinical symptoms and could lead to sensitization and allergy (Buskirk, Green et al. 2014).

Furthermore, the inhalation of microbiological aerosols can lead to clinically relevant events, such as the deterioration of a preexisting chronic obstructive pulmonary disease (COPD) or the development of an organic dust toxic syndrome (ODTS), asthma, allergies and hypersensitivity pneumonitis (Heldal, Halstensen et al. 2003; Rylander, Fogelmark et al. 2008; Templeton, Buskirk et al. 2010; Oremland, Michels et al. 2016; Straumfors, Heldal et al. 2016).

Although healthy individuals can mount a suitable immune response to biological aerosols, their presence even at moderate concentrations is a known risk-factor for immunocompromised individuals or persons suffering from allergies and respiratory diseases (Heldal, Halstensen et al. 2003; Liu, Huang et al. 2016). Establishing the bioaerosol levels at which health outcomes are observable is therefore needed to provide the scientific background for approval and surveillance authorities, which can make recommendations for safe concentrations of microbial bioaerosols.

Given the varied distribution and potential health effects of biological aerosols, known exposure limits and standardized sampling methods are therefore necessary. It is expected that the health effects of bioaerosol exposure follow a dose dependent model. Additionally, of main interest from a regulatory standpoint are the No-Observed-Adverse-Effect Level (NOAEL) and the Lowest-Observed-Adverse-Effect Level (LOAEL). As evidenced from our previous review on human studies (Walser, Gerstner et al. 2015), these important exposure levels have not yet been described for human exposure to mixed or species specific biological aerosols that are commonly found in the environment.

From the studies included in the previous systematic review (Walser, Gerstner et al. 2015) on bioaerosol exposure in human studies we concluded that there were not enough data to establish a dose-response relationship for the derivation of exposure limits and proposed the use of animal experimental studies to derive the general exposure limits of bioaerosols. The results of such animal studies can be used to estimate suitable thresholds for humans using standard toxicological approaches. Many animal models of bioaerosol exposure are available to characterize the pulmonary response, however most use intratracheal and intranasal exposure (Baseler, Fogelmark et al. 1983). Most models were developed to measure the response to individual antigens, endotoxins, mycotoxins or liquid suspensions, which may not provide a suitable comparison to human exposure, but are more useful to explore the sensitization pathway.

Whole body or nose only apparatuses are more suitable for simulating the environmental exposures of aerosols via inhalation. This approach allows various concentrations of bioaerosols and dust to be aerosolized and delivered normally via the respiratory airways. While the concentration in the air is known, only a certain amount of microbiological bioaerosols is inhaled and a fraction of this actually reaches the alveolar sacs (Madsen, Larsen et al. 2016). Therefore, the true lung exposure concentration is unknown when this method is used (Templeton, Buskirk et al. 2010).

Aim of study

The aim of this systematic review was to derive exposure limits of microbial bioaerosols related to health effects based on experimental animal studies in collaboration with a bioaerosol expert network.

Material and methods

The methods used in this systematic review have been analogous to those used in the previous review on dose-response relationships of microbial bioaerosols on humans (Walser, Gerstner et al. 2015). The expert network established for this review was also involved in evaluating the selected paper and derivation of threshold values.

Search query

The literature search was done in MEDLINE using the PubMed interface. The final search (see below) was done and exported to EndNote on the 19th June 2015.

(animal model OR mouse OR rabbit OR rat OR rodent OR murine) AND ("inhalation"[All Fields] OR aerosolized OR aerosol OR bioaerosols OR bio-aerosol OR "Environmental Exposure"[MeSH Terms]) AND ((aspergill OR "fungi"[All Fields] OR "fungi"[MeSH Terms] OR "mold"[All Fields] OR "mould"[All Fields] OR "molds"[All Fields] OR "moldy"[All Fields] OR mouldy OR actinomycetes OR Penicillium OR Stachybotrys OR Alternaria) OR ("bacteria"[All Fields] OR "bacteria"[MeSH Terms])) AND ("conidia"[All Fields] OR spore OR hyphae OR dose OR colony forming units OR cfu OR c.f.u.) AND (respiratory OR pulmonary OR pneumonia OR allergic OR sensitization OR histology OR asthmatic OR inflammation OR inflammatory OR cytokine OR immunoassay) NOT ("anthrax"[All Fields] OR "bacillus anthracis"[All Fields] OR mycobacterium OR "viruses"[MeSH Terms] OR "viruses"[All Fields] OR "virus"[All Fields] OR "vaccines"[MeSH Terms] OR "vaccines"[All Fields] OR "vaccine"[All Fields] OR bird OR tularensis OR cigarette OR transplant OR "drug therapy" OR "Antimetabolites"[Mesh] OR "Anti-Inflammatory Agents/pharmacology"[Mesh] OR "Antioxidants/pharmacology"[Mesh] OR "Anti-Infective Agents"[Mesh] OR "Drug Therapy, Combination"[Mesh]) AND (English[lang] OR German[lang])*

This search query was further divided into two smaller searches, separating fungal from bacterial studies (Fig. 1). The search query was constructed from five search strings joined by the Boolean operator AND, plus one section joined with NOT. This structured approach made it easier to develop a suitable strategy. The first string targeted the animal exposed, followed by method of exposure, microorganism used, measurement unit and outcomes measured. Terms related to birds, viruses, pharmacologic agents, smoke and known human obligate-pathogens were included in the NOT string as they represented themes not relevant to the present review question. The results were filtered for language so that only studies written in English or German were included. No limitation on the date of publication was applied.

Selection criteria

Studies were included or excluded by following the criteria in the order presented in Table 1. The inclusion and exclusion criteria for the abstract and the full-text

screening were adapted from a previous study (Walser, Gerstner et al. 2015), taking into consideration the requirements for the study duration, frequency and length of the exposure (Nayak, Green et al. 2016).

The abstract screening was only performed on the inhalation studies as they were deemed more suitable for establishing exposure thresholds by the expert network. Separate folders were created for each of the inclusion and exclusion criteria. The second screener was therefore able to check the selection process and disagreements were resolved by consensus.

Data extraction

Data was extracted into a standardized database (Microsoft Access 2010, Microsoft Corporation, Washington, USA). Information about study design, animals exposed, microorganism culture conditions, exposure measurements and health outcomes were included. Most of the data were presented as graphs with no absolute numbers. In order to increase the accuracy of the data extraction, screenshots were taken and the length of the bars was measured using the ruler tool in Adobe Photoshop CS6. The scale was also measured and used to convert the pixel numbers back into absolute values. This was done both for the mean and for standard error points.

The confidence intervals were built based on the standard error values reported in the study. In Fogelmark, Rylander et al. (1989) no description of the error bars interpretation was given and building the confidence interval resulted in values below 0 for the lower confidence interval. Therefore it was assumed that these error bars already represented the 95% confidence interval.

All the included studies reported the macrophage, neutrophil, eosinophil and lymphocyte cell counts in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) following exposure to *Aspergillus fumigatus*, alone or in a mixture. In order to facilitate comparison of the different studies, the data above was summarized as a scatter plot with horizontal error bars representing the 95% confidence interval (Fig. 2) (SigmaPlot 11, Systat Software GmbH., Germany).

Contact with the authors

Some studies contained unclear aspects and clarification with the corresponding authors of the papers was sought.

Results

Study selection

The overall search query returned 301 results. As described in the methods section, this search was further divided into 2 search queries, one for bacteria (163 studies) and one for fungi (138 studies) (Fig. 1).

Out of the 138 fungal inhalation studies, four studies were included after full text screening. From 163 studies on bacteria, none fulfilled the criteria for inclusion (Fig. 1). Details on the reasons for exclusion are given in Fig. 1. Shortly, 32% (44) of fungal studies were excluded because no inhalation experiments were performed, 24% (33) only had acute exposure, and 22% (31) were removed because no *in vivo* animal experiments were done. In contrast, 44% (71) of bacterial studies were removed because the main exposure contained a type of toxin, 33% (54) only had acute exposure, 17% (28) were not inhalation experiments and 5% (8) were not *in vivo* experiments. Finally, four fungal studies and no bacterial study were selected for data extraction and were presented during a meeting with the bioaerosol expert network from the previous systematic review. The objective of this meeting was the assessment of selected studies with respect to the derivation of health-related exposure thresholds.

Study characteristics

The included studies were published between 1989 and 2014 (Table 2). Three studies (Fogelmark, Rylander et al. 1989; Fogelmark, Lacey et al. 1991; Fogelmark and Rylander 1993) were carried out by the same research group and therefore share some characteristics such as the methods for outcome measurement. These three studies were carried out on male and female guinea pigs, and the other study (Buskirk, Green et al. 2014) was conducted using female BALB/cJ mice. Contact with the authors was unsuccessful for older studies. Only one detail regarding the number of animals in Fogelmark, Lacey et al. (1991) was obtained.

Animals were exposed to different genera of fungi in the four studies. One of the studies mentioned only moldy hay as origin but did not provide any analysis of the generated aerosol (Fogelmark and Rylander 1993). Animals were exposed to *Aspergillus fumigatus* spores in three of the studies; however, the concentration of the exposure dose varied from 10^5 to 10^9 spores/m³. In addition, Fogelmark, Rylander et al. (1989) only reported the concentration of the whole mixture, not individually for *A. fumigatus*. Only one paper described exposure to two

concentrations of the same microorganism, 7×10^5 and 3×10^7 spores/m³ *A. fumigatus*, while keeping the rest of the experimental parameters the same (Fogelmark, Lacey et al. 1991).

The duration of exposure varied between two weeks and 12 weeks. The frequency of exposure also varied between the studies, from 2h/day, 2 days/week to 4h/day, 5 days/week (Table2). For all the studies a period of 24h was allowed to pass after the last exposure and the moment where the BALF was collected. Additionally one study (Buskirk, Green et al. 2014) also collected the BALF 4h, 48h and 96h after a 4 week exposure. Fogelmark and Rylander (1993) also measured the BALF 3 and 7days in addition to 24h after a 12 week exposure.

All of the studies reported the BALF concentration of macrophages, neutrophils, lymphocytes and eosinophils at the different time points (Fig. 2). Most studies also described the histological condition of the lung, including the presence of granulomas but this was not quantitatively assessed. Despite the varying exposure conditions, all the included studies exposed animals to *Aspergillus sp.*. However, two studies only exposed animals to *Aspergillus sp.* as part of a mixture of aerosolized spores and conidia. Buskirk, Green et al. (2014) reported significant increase of macrophages, neutrophils, eosinophils, B and T cells 48hr after the last exposure to 1×10^5 *Aspergillus fumigatus* conidia deposited in the lung. However, 72h after the last exposure the number of macrophages, eosinophils and lymphocytes seemed to lower again. In Fogelmark and Rylander (1993) all measured cell types were observed to significantly increase in the BALF after 5 weeks of exposure.

Additionally, all measured cell types, except eosinophils remained elevated after 12 weeks of exposure to spores from moldy hay at a concentration of 10^9 spores/m³. Nevertheless, similarly to Buskirk, Green et al. (2014), the number of recruited cells drops again during the 3 days after the end of the exposure. Fogelmark, Lacey et al. (1991) reported significant increase of macrophage and neutrophil numbers after 3 and 5 weeks of continued exposure to 3×10^7 spores/m³ *Aspergillus fumigatus* but not to 7×10^5 spores/m³. Nevertheless significant increase in eosinophil and lymphocyte numbers was reported at both exposure concentrations. Furthermore, other fungi (*Phanerochaete crysosporium*, *Rhizopus stolonifera*, *Penicillium sp.* and *Faenia rectivirgula*) also produced significant increase in macrophages, lymphocytes and eosinophils 5 weeks after the start of the exposure. The Fogelmark, Rylander et al. (1989) study also reports that exposure to a characterized mixture of 10^8 - 10^9

spores/m³ from incubated wet hay significantly increases the number of macrophages, neutrophils, eosinophils and lymphocytes in BALF after 3 or 5 weeks.

Discussion

This systematic review aimed to identify studies suitable for derivation of exposure limits of microbial bioaerosols related to health effects based on experimental animal studies. Among the studies exposing animals to bioaerosols, very few had a well described quantified exposure. The outcomes resulting from the exposure to microbial bioaerosols were however better characterized. A dose of 10⁵ *A. fumigatus* conidia deposited in the lung elicited an immune response (Buskirk, Green et al. 2014). No lower dose was tested meaning that LOEL and NOEL could not be derived. While all the included studies indicated a significant increase in the number of immune cells present in BALF after repeated exposure to microbial bioaerosols, differences between studies and lack of a standardized exposure procedure made comparison between studies difficult.

A high number of studies were excluded from the results of the search query because authors often use both intranasal and inhalation in their abstracts, often as “intranasal inhalation”. Furthermore, these studies were targeted at identifying cytokines or other signaling pathways where an acute exposure with intranasal or intratracheal delivery makes sense. A second reason for the high number of excluded papers is that *ex vivo* and *in vitro* studies share many common keywords with *in vivo* studies. A large part of the studies were included for full-text screening because it was difficult to conclude from the abstract alone if whether acute or chronic exposure was tested.

Comparisons between studies can be difficult due to methodological differences. Comparison within one study is thus more reliable; however studies are often limited in the range of microorganisms and doses tested. There have been several review articles published covering both intratracheal, intranasal and inhalation exposure of small animals to bioaerosols (Templeton, Buskirk et al. 2010; Oremland, Michels et al. 2016). Oremland, Michels et al. (2016) suggests a lowest observable effect level (LOEL) of 7*10⁴ *A. fumigatus* spores/m³ in guinea pigs based on the study by Fogelmark, Lacey et al. (1991), however no lower dose was included in that study. None of the review articles provided a detailed description of the literature screening/searching process or the results of the animal experiments.

As can be seen from the four included studies, there is no standardized procedure for aerosolization (Madsen, Larsen et al. 2016); some methods were as basic as agitating a sack of hay (Fogelmark, Rylander et al. 1989) or as complex as sonication controlled by a computer to maintain consistent air concentration (Buskirk, Green et al. 2014). All these methods result in different quality of bioaerosols. Nevertheless, there have been recent advancements in generating and accurately monitoring the quality and quantity of bioaerosols in controlled conditions (Buskirk, Green et al. 2014; Madsen, Larsen et al. 2016).

Regardless of the differences in exposure conditions, in all included studies at least one significant increase in the number of immune cells in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was detected following exposure to microbial bioaerosols. At five weeks, there is a suggestion of dose-response, *i.e.* increase in dose from 10^6 to 10^9 spores/m³ resulted in increased numbers of macrophages, eosinophils and neutrophils, however there is visible overlap of the confidence interval. Exposure to mixed bioaerosols resulted in increased numbers of the inflammatory cells compared to studies where *A. fumigatus* was the only component of the bioaerosol (Fogelmark, Lacey et al. 1991; Buskirk, Green et al. 2014). This can be due to the presence of additional mycotoxins and *Actinomyces sp.* (Rylander, Fogelmark et al. 2008; Straus 2009).

As expected, the number of neutrophils slowly reduces after the end of the exposure (Jonsson, Atosuo et al. 2015). The increase in the level of eosinophils present in BALF suggests the possibility of a developing allergic response (Anderson, Lemanske et al. 2016; Elhaik Goldman, Moshkovits et al. 2016) when *A. fumigatus* concentration was at 10^9 spores/ m³.

An observation that was raised during the consensus meeting was that in the Buskirk, Green et al. (2014) study, a bioaerosol challenge was made twice weekly (every 3-4 days), which corresponds to the length of time reported after the last challenge. In the reported results the level of immune cells in BALF begins to drop by day three after the last exposure which indicates that the cycle was reset throughout the exposure period. Therefore an increased frequency of exposure is needed to correctly measure the impact of bioaerosol exposure at the end of the experiment. Taking the above issue and the limitations already described into consideration, it was the opinion of the bioaerosol expert group that the Buskirk, Green et al. (2014)

study was a suitable pilot study which can be improved for the derivation of health-related exposure limits.

Limitations

Review limitations

The search strategy aimed to include as many relevant papers as possible. While focusing on the MEDLINE database allowed the inclusion of health-relevant research, it omitted journal/articles that might have been present in other databases. Data extraction was complicated by the absence of absolute values, the results being reported mainly as bar graphs. Although, careful measurement was performed using digital tools, for very small values the estimation adds a new layer of error.

Moreover, the number of animals for each exposure was vaguely described in some studies which limited weighting and pooling of the study outcomes (Fogelmark, Rylander et al. 1989; Fogelmark, Lacey et al. 1991).

The different time points for examination of the exposed animals made the comparison between studies difficult. The measurement of the concentration of aerosolized particles was mostly reported using spores/m³. However, Buskirk, Green et al. (2014) reported only absolute number of spores deposited in the upper respiratory airways. While the authors argue that this dose is similar to that of worker breathing air with a concentration of $5,60 \times 10^4$ conidia for 45 years, the selection of equivalency and conversion factors further introduces uncertainty in the results and prevents easy inter-study comparison.

While the results from the same main researcher can be compared, it is more difficult to compare the results from Fogelmark, Lacey et al. (1991) and Buskirk, Green et al. (2014). In the Buskirk, Green et al. (2014) study the values of BALF cells in the control animals have lower values compared to the other three studies (Fogelmark, Rylander et al. 1989; Fogelmark, Lacey et al. 1991; Fogelmark and Rylander 1993), thus perhaps a different extraction or counting method was used (Fig.2).

Due to large inconsistencies in exposure assessment between studies, the pooling of the data would not have resulted in meaningful estimates and was therefore omitted.

Studies limitations

Furthermore, controls for the studies were exposed only to filtered air but not to sterilized rice or hay meaning that possible particles from the media were not controlled for and may have introduced a differential effect change, i.e. overestimating the effect of the bioaerosols. Dorribo, Wild et al. (2015) report

respiratory problems related to exposure to wheat dust and Krysinska-Traczyk and Dutkiewicz (2000) characterize different samples of grain dust. Furthermore, Pranav and Biswas (2016) mention rice dust as a health concern for workers of rice mills. Results for the control group were also not reported for each time point (Fogelmark, Lacey et al. 1991).

Another problem encountered in the studies was that no details were provided if different batches of cultures were used, at which time point they were used and how similar the concentrations and types of bioaerosols were between the different batches. Such a characterization would have been especially important for the Fogelmark and Rylander (1993) study where moldy hay was used as a fungal spore source.

Implications for future research

During the literature screening, it became apparent that the focus of most of the research in the area of bioaerosols was not aimed at deriving exposure limits. As such, the exposure was not well controlled and documented. The focus was rather on the immunological outcomes which were adequately characterized.

While a mixed exposure would be more similar to what would be experienced in normal environmental conditions (Madsen, Larsen et al. 2016), it further complicates the establishment of threshold exposure levels. The derived threshold levels would be specific for that particular mixture of bacteria and fungi at a specific ratio. Without knowing the impact of individual species on the respiratory system, it would be difficult to suggest threshold levels. Therefore, a more applicable model would be to evaluate the threshold for certain key bioaerosols first (Templeton, Buskirk et al. 2010; Buskirk, Green et al. 2014) and then see the effect of a mixed exposure. The generation and quantification of bioaerosols should also be similar to those described in previous studies in order to improve comparability.

Acute exposure to bioaerosols is useful in understanding the pathological mechanism (Hoselton, Samarasinghe et al. 2007), however normal environmental exposure is characterized by low doses of bioaerosol over a long time (Walser, Gerstner et al. 2015). This different exposure pattern means a change in the immune response (Tanaka, Boon et al. 2015; Pinkerton, Kim et al. 2017), therefore the experimental design should be adapted to be more similar to chronic exposure to bioaerosols, similar to studies involving dust or smoke (He, Ichinose et al. 2012; Dorribo, Wild et

al. 2015). This includes longer exposure duration: 4h per day, 5 days per week for at least 4 weeks at a lower concentration of bioaerosols (personal communication with the experts). In addition to a control group exposed to clean air, exposing another group to uncolonized culture media would help detect only the impact attributable to fungi or bacteria. Although the present literature does not allow an accurate estimation of the exposure limits, in the future, this will be facilitated by advancements in particle aerosolization and quantification techniques, as well as improved experimental design and following standardized methods for aerosol exposure. Overall, as the experts concluded, comparison and replication of studies would be greatly facilitated by a standardized method for exposure measurement and aerosol generation as well as improved descriptions of the bioaerosols and animals used.

Conclusions

It is our conclusion that more experimental research needs to be done with the specific aim of establishing a no observable effect level (NOEL) and a lowest observed effect level (LOEL) for bioaerosols, specifically for airborne fungal spores and bacteria. Establishing these levels based on health outcomes provides the scientific background for approval and surveillance authorities, which can regulate and take action to protect those more vulnerable to microbiological aerosols such as those with allergy or immune deficiency.

The analysis of experimental animal studies showed that observed health effects were probably dose-dependent and well described. Nevertheless, the outcomes of the studies could not be directly compared due to the large degree of variation and poor description of the exposure. As was previously mentioned in another systematic review (Nayak, Green et al. 2016), there is a need for standardized methods for aerosolization of bioaerosols and measurement of repeated bioaerosol exposure. Therefore, expertise of both exposure and outcome assessment should be brought together to enable appropriate experimental animal studies with properly generated aerosols aiming on the derivation of exposure limits. All in all, it appears possible to conduct appropriate dose-response studies by producing aerosols in a methodologically proper way and providing exact air concentration of certain key bioaerosols.

Acknowledgements

Funding source: This study was funded by the German Social Accident Insurance (DGUV). The funding source had no involvement in the research or preparation of the article.

References

- Ad-hoc-Arbeitsgruppe-Innenraumrichtwerte (2012). "Richtwerte für die Innenraumluft: erste Fortschreibung des Basisschemas." Bundesgesundheitsblatt **55**: 279-290.
- Anderson, H. M., R. F. Lemanske, Jr., et al. (2016). "Relationships among aeroallergen sensitization, peripheral blood eosinophils, and periostin in pediatric asthma development." J Allergy Clin Immunol.
- Baseler, M. W., B. Fogelmark, et al. (1983). "Differential toxicity of inhaled gram-negative bacteria." Infect Immun **40**(1): 133-138.
- BioStoffV (2013). "Verordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen (Biostoffverordnung - BioStoffV)." Bundesministeriums der Justiz in Zusammenarbeit mit der juris GmbH: 1-19.
- Blease, K., B. Mehrad, et al. (2000). "Enhanced pulmonary allergic responses to *Aspergillus* in CCR2^{-/-} mice." J Immunol **165**(5): 2603-2611.
- Bünger, J., A. Deckert, et al. (2011). Health complaints, lung function, and immunologic effects in German compost workers from long-term exposures to bioaerosols. The Proceedings of the 6th international scientific conference on bioaerosols, fungi, bacteria, mycotoxins in indoor and outdoor environments and human health, New York.
- Buskirk, A. D., B. J. Green, et al. (2014). "A murine inhalation model to characterize pulmonary exposure to dry *Aspergillus fumigatus* conidia." PLoS One **9**(10): e109855.
- Dorribo, V., P. Wild, et al. (2015). "Respiratory health effects of fifteen years of improved collective protection in a wheat-processing worker population." Ann Agric Environ Med **22**(4): 647-654.
- Elhaik Goldman, S., I. Moshkovits, et al. (2016). "Natural Killer Receptor 1 Dampens the Development of Allergic Eosinophilic Airway Inflammation." PLoS One **11**(8): e0160779.
- Fogelmark, B., J. Lacey, et al. (1991). "Experimental allergic alveolitis after exposure to different microorganisms." Int J Exp Pathol **72**(4): 387-395.
- Fogelmark, B. and R. Rylander (1993). "Lung inflammatory cells after exposure to mouldy hay." Agents Actions **39**(1-2): 25-30.
- Fogelmark, B., R. Rylander, et al. (1989). "Experimental allergic alveolitis after inhalation of mouldy hay." J Clin Lab Immunol **30**(2): 81-85.
- Grenzwerteliste (2013). IFA Report 1/2013. Sicherheit und Gesundheitsschutz am Arbeitsplatz.
- He, M., T. Ichinose, et al. (2012). "Asian sand dust enhances murine lung inflammation caused by *Klebsiella pneumoniae*." Toxicol Appl Pharmacol **258**(2): 237-247.
- Heldal, K. K., A. S. Halstensen, et al. (2003). "Upper airway inflammation in waste handlers exposed to bioaerosols." Occup Environ Med **60**(6): 444-450.
- Hermann-Kunz, E. and W. Thierfelder (2001). "Allergische Rhinitis und Sensibilisierungsraten—Nimmt die Prävalenz wirklich zu? Wie sicher sind unsere Informationen?" Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz **44**(7): 643-653.
- Hoselton, S. A., A. E. Samarasinghe, et al. (2007). "Creation and characterization of an IgG1-type monoclonal antibody against intact *Aspergillus fumigatus* conidia." Hybridoma (Larchmt) **26**(4): 251-254.
- Jonsson, M., J. Atosuo, et al. (2015). "Repeated dose 28-day oral toxicity study of moniliformin in rats." Toxicol Lett **233**(1): 38-44.
- Krysinska-Traczyk, E. and J. Dutkiewicz (2000). "*Aspergillus candidus*: a respiratory hazard associated with grain dust." Ann Agric Environ Med **7**(2): 101-109.
- Liu, Y., X. Huang, et al. (2016). "Detection of *Talaromyces marneffe* from Fresh Tissue of an Inhalational Murine Pulmonary Model Using Nested PCR." PLoS One **11**(2): e0149634.
- Madsen, A. M., S. T. Larsen, et al. (2016). "Generation and Characterization of Indoor Fungal Aerosols for Inhalation Studies." Appl Environ Microbiol **82**(8): 2479-2493.
- Nayak, A. P., B. J. Green, et al. (2016). "Subchronic exposures to fungal bioaerosols promotes allergic pulmonary inflammation in naive mice." Clin Exp Allergy.

- Olenchock, S. A., F. H. Green, et al. (1983). "In vivo pulmonary response to *Aspergillus terreus* spores." Comp Immunol Microbiol Infect Dis **6**(1): 67-80.
- Oremland, M., K. R. Michels, et al. (2016). "A computational model of invasive aspergillosis in the lung and the role of iron." BMC Syst Biol **10**(1): 34.
- Pinkerton, J. W., R. Y. Kim, et al. (2017). "Inflammasomes in the lung." Mol Immunol.
- Pranav, P. K. and M. Biswas (2016). "Mechanical intervention for reducing dust concentration in traditional rice mills." Ind Health **54**(4): 315-323.
- Radon, K. and D. Nowak (2003). "Atemwegs- und Lungenerkrankungen in der Europäischen Landwirtschaft Teil 1: Literaturübersicht." Pneumologie **57**(08): 444-448.
- Rylander, R., B. Fogelmark, et al. (2008). "Moldy environments and toxic pneumonitis." Toxicol Ind Health **24**(3): 177-180.
- Straumfors, A., K. K. Heldal, et al. (2016). "Cross-shift study of exposure-response relationships between bioaerosol exposure and respiratory effects in the Norwegian grain and animal feed production industry." Occup Environ Med **73**(10): 685-693.
- Straus, D. C. (2009). "Molds, mycotoxins, and sick building syndrome." Toxicol Ind Health **25**(9-10): 617-635.
- Tanaka, R. J., N. J. Boon, et al. (2015). "In silico modeling of spore inhalation reveals fungal persistence following low dose exposure." Sci Rep **5**: 13958.
- Templeton, S. P., A. D. Buskirk, et al. (2010). "Murine models of airway fungal exposure and allergic sensitization." Med Mycol **48**(2): 217-228.
- TRBA-466 (2012). Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin - BAuA (http://www.baua.de/nr_15268/de/Themen-von-A-Z/Biologische-Arbeitsstoffe/TRBA/pdf/TRBA-466.pdf aufgerufen am 09.07.12).
- van Kampen, V., A. Deckert, et al. (2012). Gesundheitsrisiken durch biologische Arbeitsstoffe in Kompostierungsanlagen. Forschung Projekt F 2063. BAUA.
- VDI-4250-1 (2014). Bioaerosole und biologische Agenzien -Umweltmedizinische Bewertung von Bioaerosol-Immissionen -Wirkungen mikrobieller Luftverunreinigungen auf den Menschen. Weißdruck. Düsseldorf, Verein Deutscher Ingenieure: 1-23.
- VDI (2009). "Abschätzung des gesundheitlichen Risikos im Immissionsschutz." VDI 2308 Blatt 1.
- Walser, S. M., D. G. Gerstner, et al. (2015). "Evaluation of exposure-response relationships for health effects of microbial bioaerosols – A systematic review." International Journal of Hygiene and Environmental Health.
- Walser, S. M., D. G. Gerstner, et al. (2015). "Evaluation of exposure-response relationships for health effects of microbial bioaerosols - A systematic review." Int J Hyg Environ Health **218**(7): 577-589.

Table 1 Inclusion and exclusion criteria for abstract and full-text screening.

Inclusion criteria	Code
Experimental animal studies to specific fungi or bacteria species with <ul style="list-style-type: none">• inhalation of bioaerosols• repeated exposure, preferably 4h/d, 5d/week, 4weeks• concentration of exposure in .../m³• target organ lung/respiratory system	I1
Mode of delivery, quantification of exposure or duration/repeats unclear	I2
Exclusion criteria	
No living animals exposed	E1
Research only on known human pathogens (M. pneumonia, S. pneumonia, M. tuberculosis)	E2
Exposure only to antigens, endotoxins, and mycotoxins	E3
Only exposed via another delivery mechanism (intranasal, intratracheal, subcutaneous)	E4
Clear statement of one-time exposure	E5
Observed outcome outside the respiratory system	E6
Lacking any exposure concentration	E7
Publications in languages other than English or German	E8
Multiple publications are excluded	E9

Table 2 Study characteristics of included fungal inhalation studies.

Reference	Microorganism	Culture method	Animal	Exposure dose	Exposure duration	Examination time	Results analyzed
Buskirt et al. (2014)	<i>Aspergillus fumigatus</i> WT and alb1	Dry brown rice	7-10 BALB/cJ female mice per time point exposed, 30 mice per time as control	1×10^5 conidia deposited in lung	2h/day, 2d/week for 4 weeks	4, 24, 48 and 72h after last exposure	BALF increased counts of macrophages, eosinophils, neutrophils, B cells, CD8+ CD4+, Serum IgE, IgG antibodies present.
Fogelmark et al. (1993)	Spores from moldy hay	Wet hay stored at 35°C for 3-4 weeks	5 female guinea pigs (400-500g)	10^9 spores/m ³	4h/d, 5d/week for 5 or 12 weeks	24h after last exposure, 3d and 7d after last exposure	After 5 weeks sig. increase in macrophages, lymphocytes and neutrophils in the lung wall. After 12weeks less increase in macrophages, lymphocytes and neutrophils in the lung lavage. Cell numbers remained elevated 7 days after, except for neutrophils.
Fogelmark et al. (1991)	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Phanerochaete</i>	Rice at 38°C for 3-6 days	20 Guinea pigs (300-500g) per group	7×10^5 3×10^7 spores/m ³ 2×10^9	4h/d 5d/week for 3 or 5 weeks	24h after last exposure	Sig. increase in lymphocytes and eosinophils (3,5weeks) Sig. increase in macrophages, lymphocytes, neutrophils and eosinophils (3, 5 weeks). Sig. increase in macrophages,

	<i>crysosporium</i>			spores/m ³			lymphocytes, neutrophils and eosinophils (5weeks).
	<i>Rhizopus stolonifera</i>			2*10 ⁷ spores/m ³			Sig. increase in macrophages, lymphocytes and neutrophils (3, 5 weeks).
	<i>Penicillium auratiogriseum</i>			1*10 ⁹ spores/m ³			Sig increase in lymphocytes and eosinophils (5weeks)
	<i>Faenia rectivirgula</i>	Rice at 50°C for 3-6 d		3*10 ⁸ spores/m ³			Sig. increase in macrophages, lymphocytes and eosinophils (3, 5 weeks).
Fogelmark et al. (1989)	Fungi: <i>Rhizopus absidia</i> <i>Aspergillus sp.</i> <i>Eurotium sp.</i> <i>Scopulariopsis</i> <i>Gumicola lanuginose</i> <i>Thermoascus</i> <i>Penicillium</i> Yeasts Bacteria <i>Thermoactinomyces sp.</i> <i>Streptomyces sp.</i>	Wet hay incubated at 35°C	20 guinea pigs (300-500g)	10 ⁸ -10 ⁹ spores/m ³	4h/day 5d/week for 3 or 5 weeks	24h after last exposure	Increase in macrophage, neutrophil, eosinophil and lymphocyte numbers at 3, 5 weeks Presence of alveolar cell infiltrates and early granulomas

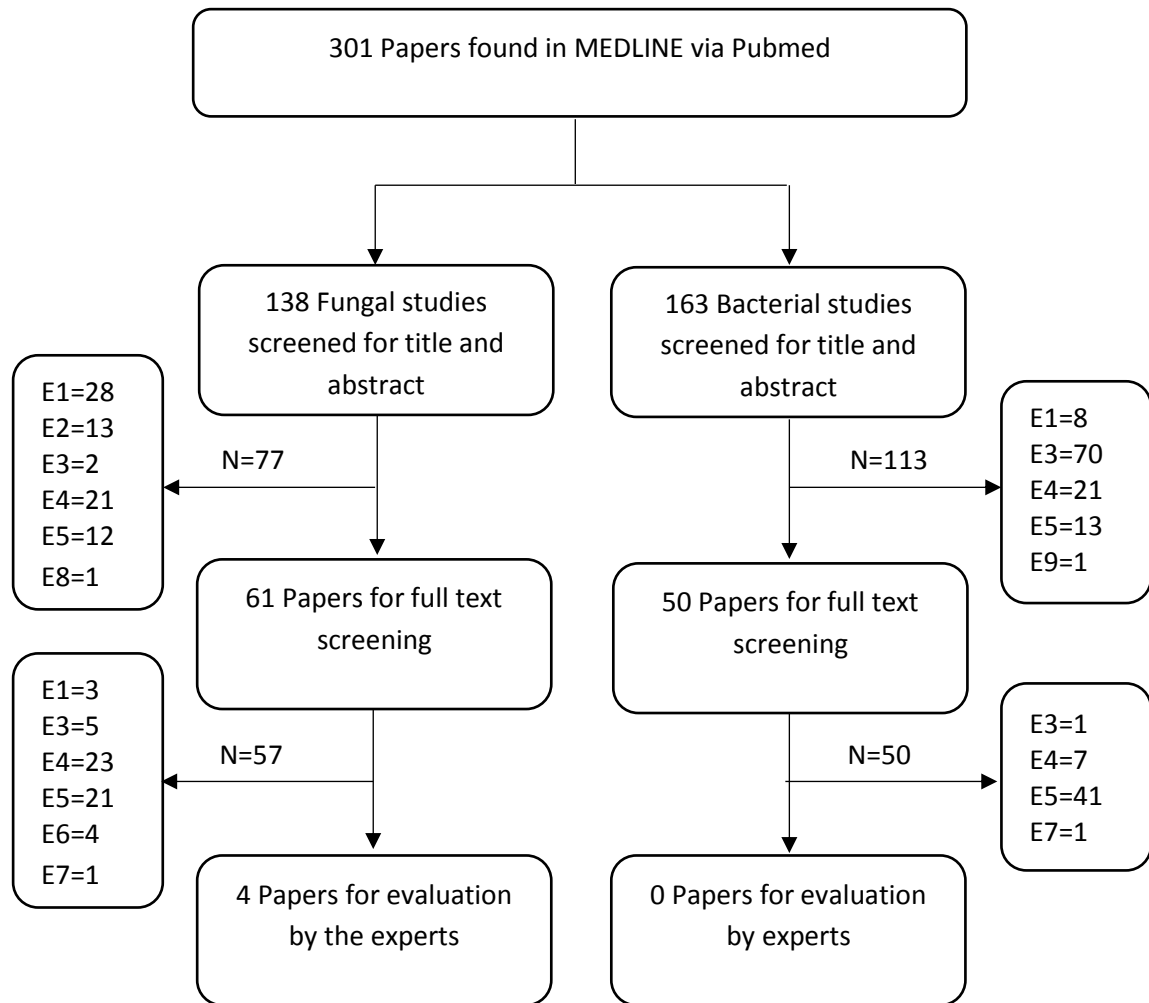


Figure 1. Flowchart of study selection with number of included and excluded inhalation studies during abstract screening and full-text screening. For a full explanation of the exclusion criteria (E) please see Table 1.

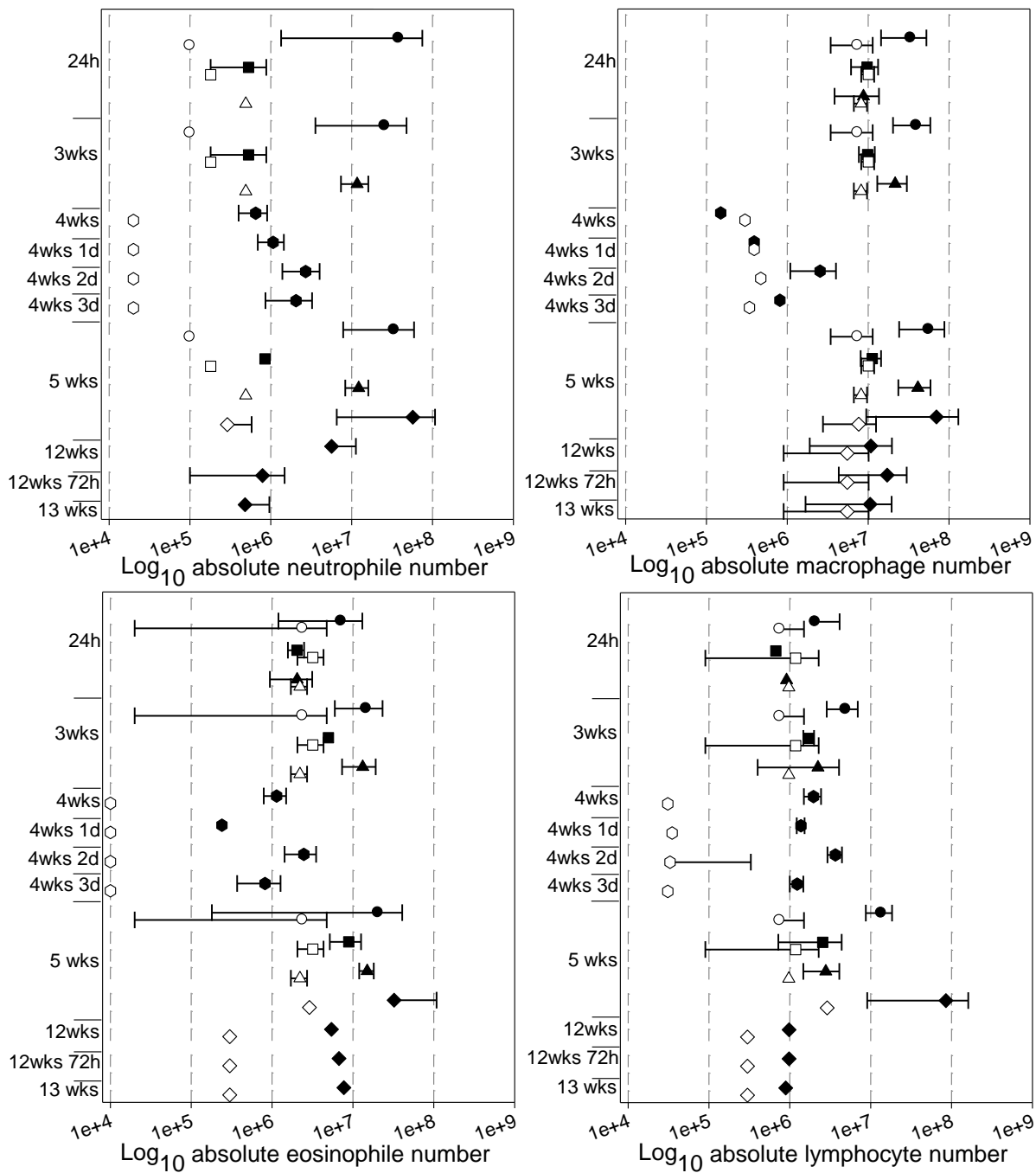


Figure 2. Total cell counts in the BALF as reported by Buskirk *et al.* 2014 (Hexagon); Fogelmark *et al.*, 1993 (Diamond); Fogelmark *et al.*, 1991, *Aspergillus fumigatus* $7 \cdot 10^5$ spores/ m^3 (Square); Fogelmark *et al.*, 1991, *A. fumigatus* $3 \cdot 10^7$ spores/ m^3 (Triangle); Fogelmark *et al.*, 1989 (Circle). Filled symbols were used for the experimental group and empty symbols for the control group. A detailed account of the exposure parameters is summarized in Table 2.

Steckbriefe

Für die Studien, die im Rahmen des systematischen Reviews ausgewählt wurden, wurden die wesentlichen Ergebnisse in Form von Steckbriefen zusammengefasst und den Teilnehmern des Experten-Meetings präsentiert.

Barford (2010)		
Sub-chronic lung inflammation after airway exposures to <i>Bacillus thuringiensis</i> biopesticides in mice		
		comments
Species:	female BALB/cJ mice, 6-8 weeks old, body weight 18-22 g	
Number of animals:	18 mice (n=9 per group) for inhalation experiments	
Microorganism:	<i>Bacillus thuringiensis</i> : B.t israelensis or B.t kurstaki	
Culture method:	not used	
Application:	acute and subchronic intratracheal instillation and inhalation (repeated); bacterial suspensions were prepared from commercially available insecticides Vectobac® or Dipel® for aerosol generation in exposure chamber	
Exposure dose	for inhalation: 5×10^4 CFU per mouse per exposure	
Exposure duration	subchronic: 1h/day for 5 days/week for 2 weeks (to simulate occupational exposure)	
Effect examination:	after 70 days (Table 1) post-final exposure	
Effects analysed:	in BALF: number of neutrophils, lymphocytes, macrophages, epithelial cells, eosinophils histology of lung: degree of inflammation and morphological changes (section, staining and microscopy)	
Effects: Inhalation	in BALF: author's answer: we did not test the BAL cells of the 70 day group, we only did the histology and showed the remaining inflammation. histology of lung: subchronic inflammation was appearant as small patches of interstitial inflammation (Fig. 5 G-H)	
Statistical method:	nonparametric analysis of variance (Kruskall-Wallis) for comparison between groups; Mann-Whitney's U for pair-wise comparisons; $p < 0.05$ was chosen as level of significance	

Anmerkung: Aufgrund der guten Beschreibung der Expositionsseite wurde diese bakterielle Tierstudie den Experten vorgestellt, obwohl sie bezüglich der fehlenden Angaben zu der Messung der subchronischen Effekte nach 70 Tage ausgeschlossen wurde.

Buskirk (2014)
A murine inhalation model to characterize pulmonary exposure to dry *Aspergillus fumigatus* conidia

		comments
Species:	female BALB/cJ mice (aged 5-7 weeks); housed in filtered cages in groups of 5; no info on body weight	
Number of animals:	exposed: 7-10 mice / time point (4 time points); control: n = 30 mice / time point	
Microorganism:	<i>Aspergillus fumigatus</i> strains (WT and Δ alb1)	
Culture method:	culture on malt extract agar at room temperature for 14 days; <i>A. fumigatus</i> conidia were suspended in water; autoclaved dry brown rice was inoculated by <i>A. fumigatus</i> fungal suspension and the wet rice was added on petri dishes and incubated at room temperature for 10-14 days	
Application: dry fungal aerosol exposure system	aerosol generation: filtered air was directed into the acoustical generator sending a signal to vibrate at a designated frequency resulting in the formation of fungal aerosols from inoculated rice grains (see Fig. 1 A); then fungal aerosol was directed into a nose-only chamber to pass through the animals' breathing zone analysis: concentration was calculated by real-time particle counter attached to computer	
Exposure dose:	1×10^5 * <i>A. fumigatus</i> conidia deposited in the murine lung (total dose for 2 hours); no concentration in air!	
Exposure duration:	4 weeks (2 h/day, 2 days/week)	
Effect examination:	4, 24, 48, and 72 hours post-final exposure	
Effects analysed:	BALF: macrophages, eosinophils, neutrophils, lymphocytes (B cells, CD8+, CD4+ T cells) (also analysed in lymph nodes) histology of lung; (IgE and IgG antibodies in serum)	
Effects: <i>Aspergillus fumigatus</i> 1×10^5	macrophages, eosinophils: sign.increase at 48h neutrophils: sign. Increase at 24, 48, 72h (elevated neutrophil counts persisting at 72h) lymphocytes (CD8+, CD4+): depending on the subpopulation of lymphocytes, B cells, CD4+ increased significant after 48h and CD8 after 24, 48 and 72h (trending downwards); Tc17 (CD8+IL 17) cells significantly higher in BALF and pos. correlated with germination of <i>A. fumigatus</i> WT spores histology of lung: inflammation predominantly affecting the bronchioles, characterized by leukocyte infiltration (Fig. 2A), esp. at 24h and 48h (presence of IgG and IgE antibodies)	
Statistical method:	pairwise comparison by Fishers Least Significant Difference Test; proc mixed (two way ANOVA)	

*equivalent to a worker breathing a constant conidia workplace air level concentration of 5.6×10^4 spores/m³ over a 45 year working career

Fogelmark (1989)
Experimental allergic alveolitis after inhalation of mouldy hay

		comments
Species:	guinea pig (both sexes, bw 300-500 g) in cages supplied with filtered air	
Number of animals:	20 animals for controls and mouldy hay	
Microorganism:	fungi: Rhizopus, Absidia, Aspergillus spp. A. fumigatus, Eurotium spp., Scopulariopsis, Humicola lanuginosa, Thermoascus, Penicillium, Yeasts; bacteria: Thermoactinomyces spp., Streptomyces spp. (see pilot experiments)	
Culture method:	hay types: hay was wetted and placed in plastic sacks at room temperature or at 35 °C; after 3-4 weeks, mouldy hay was dried at room temperature; farmer's lung hay: farm-made wetted hay was heated and moulded to get an actinomycete-rich hay	
Application:	aerosol (actual dose was calculated after exposure) generation: mouldy hay was placed in a horizontal rotating drum to suspend spores in air which was passed into an exposure chamber monitoring: aerosol was filtered through a millipore filter, filter were suspended in saline analysis: suspended spores examined by microscope and culture: mesophilic and thermophilic fungi: Malt extract (2%) agar with pen-strep and DRBC (dichloran rose bengal chloramphenicol) agar at 25 °C (7 days) and 40 °C (6 days); xerophilic fungi: DG 18 agar at 25 °C for 7 days; bacteria and actinomycetes: nutrient agar at 25 °C (7 days) and 40 °C (6 days) and TSC (tryptone soya agar plus casein hydrolysate plus cycloheximide) at 55 °C for 4 days	
Exposure dose: mouldy hay	10(8) - (9) spores/m(3) see discussion	
Exposure duration	3 and 5 weeks (4 h/day, 5 days/week)	
Effect examination:	24 h after last exposure	
Effects analysed:	number of different cell types in lung lavage; cell infiltrates and presence of intra-alveolar cells and granulomas by lung section	
Effects: mouldy hay	increase in macrophages, neutrophils, eosinophils, lymphocytes (3/5 weeks) see Fig. 1 presence of alveolar cell infiltrates and early granulomas (histology Fig. 2)	
Statistical method:	t-test for difference between groups; Mann-Whitney U for histological preparations; p<0.005 was chosen as level of significance	

Fogelmark (1991)
Experimental allergic alveolitis after exposure to different microorganisms

		comments
Species:	guinea pig (both sexes, body weight 300-500 g); control animals from the same batch maintained in cages with filtered air during experiment period	
Number of animals:	n. a. * according to author 20 animals per group (author contacted after last expert meeting in 2014)	
Microorganism:	Aspergillus fumigatus, Faenia rectivirgula (Micropolyspora faeni), Phanerochaete chrysosporium, Rhizopus stolonifera and Penicillium aurantiogriseum	
Culture method:	culture on rice at 38 °C and 50 °C for Faenia for 3-6 days, then rice was air dried	
Application:	aerosol (actual dose was calculated after exposure) generation: dried rice was placed in a rotating horizontal drum to generate aerosol of spores which was passed into an exposure chamber monitoring: aerosol was filtered through a millipore filter, filter were suspended in saline analysis: suspended spores examined by microscope	
Exposure dose: Aspergillus fumigatus Exposure dose: Faenia rectivirgula Exposure dose: Rhizopus stolonifera Exposure dose: Phanerochaete chrysosporium Exposure dose: Penicillium aurantiogriseum	7x10(5) and 3x10(7) spores/m(3) 3x10(8) spores/m(3) 2x10(7) spores/m(3) 2x10(9) spores/m(3) 1x10(9) spores/m(3)	
Exposure duration	3 and 5 weeks (4 h/day, 5 days/week) after start of the exposure	
Effect examination:	24 h after last exposure	
Effects analysed:	number of different cell types in lung lavage; cell infiltrates and presence of intra-alveolar cells and granulomas by lung section	
Effects: Aspergillus fumigatus 7x10(5) Effects: Aspergillus fumigatus 3x10(7) Effects: Faenia rectivirgula Effects: Rhizopus stolonifera Effects: Phanerochaete chrysosporium Effects: Penicillium aurantiogriseum	sign.increase in lymphocytes, eosinophils (3/5 weeks); interstitial and intra-alveolar changes (ns) sign.increase in macrophages, lymphocytes, neutrophils, eosinophils (3/5 weeks); interstitial and intra-alveolar changes (ns) sign.increase in macrophages, lymphocytes, eosinophils (3/5 weeks); interstitial and intra-alveolar changes (ns) sign.increase in macrophages (3 weeks), lymphocytes, neutrophils (3/5 weeks); interstitial and intra-alveolar changes (ns) sign.increase in macrophages, lymphocytes, neutrophils, eosinophils (5 weeks); interstitial and intra-alveolar changes (ns) sign.increase in macrophages, lymphocytes, neutrophils, eosinophils (5 weeks); interstitial and intra-alveolar changes (ns)	
Statistical method:	t-test for difference between groups; Mann-Whitney U for histological preparations; p<0.001 was chosen as level of significance	

Fogelmark (1993)
Lung inflammatory cells after exposure to mouldy hay

		comments
Species:	female guinea pigs (body weight 400-500 g) in cages supplied with filtered air	
Number of animals:	mean of 5 animals (see Fig. 1 and 2)	
Microorganism:	n. a. (spores from mouldy hay)	
Culture method:	hay was wetted and placed in plastic sacks et 35 °C; after 3-4 weeks, mouldy hay was dried at room temperature	
Application:	aerosol (actual dose was calculated after exposure) generation: mouldy hay was placed in a horizontal rotating drum so that spores became suspended in the air which was led into the exposure chamber monitoring: aerosol was filtered through a millipore filter, filter were suspended in saline analysis: suspended spores examined by microscope	
Exposure dose	fungus spores concentration was about 10(9)/m(3)	
Exposure duration	4h/day*5d/week for 5weeks and 4h/day*5d/week for 12weeks	
Effect examination:	24 h after last exposure and 24 h and 7d after last exposure	
Effects analysed:	number of macrophages, lymphocytes, neutrophils and eosinophils in lung wall and lung lavage	
Effects	after 5 weeks sign. increase in all cell types in lung lavage, sign. increase in macrophages, lymphocytes and neutrophils in lung wall (Fig. 1) after 12 weeks+24h less but sign. increase in macrophages, lymphocytes and neutrophils in lung lavage, no sign. Increase in lung wall; +72h, 7d macrophages, lymphocytes and eosinophils remained elevated, neutrophils decreased significantly (Fig. 2)	
Statistical method:	differences between groups evaluated using Student's t-test	

Unterschriftenseite verpflichtend für Kooperationsprojekte

Projektnummer: FP-0381

Titel: Ableitung von gesundheitsbezogenen Beurteilungswerten für luftgetragene Biostoffe aus tierexperimentellen Studien

Erklärung für das Berichtswesen in Kooperationsprojekten

Bei dem vorliegenden Projekt handelt es sich **nicht** um ein Kooperationsprojekt.